



Apport de la résonance magnétique nucléaire des solides à la caractérisation chimique et à la datation des os en anthropologie médico-légale

Vanessa Urzel

► To cite this version:

Vanessa Urzel. Apport de la résonance magnétique nucléaire des solides à la caractérisation chimique et à la datation des os en anthropologie médico-légale. Anthropologie biologique. Université de Bordeaux, 2014. Français. <NNT : 2014BORD0019>. <tel-01154494>

HAL Id: tel-01154494

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01154494>

Submitted on 22 May 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS
SPÉCIALITÉ ANTHROPOLOGIE BIOLOGIQUE

Par Vanessa URZEL

**APPORT DE LA RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE
DES SOLIDES À LA CARACTÉRISATION CHIMIQUE ET À LA
DATATION DES OS EN ANTHROPOLOGIE MÉDICO-LÉGALE**

Sous la direction de : Henri Duday et Erick J. Dufourc

Soutenue le 19 mars 2014

Membres du jury :

Mme Eugénia CUNHA, Professeur, Universidade de Coimbra, Portugal	Présidente
Mme Cristina CATTANEO, Professeur, Università degli Studi di Milano, Milan, Italie	Rapporteur
Mme Agnès GIRARD-EGROT, Professeur, Université Lyon 1	Rapporteur
M. Henri DUDAY, Directeur de Recherche émérite au CNRS, Bordeaux	Directeur de thèse
M. Erick J. DUFOURC, Directeur de Recherche au CNRS, Bordeaux	Directeur de thèse
M. Yves SCHULIAR, Général, Médecin chef des services, IRCGN, Rosny-sous-Bois	Examineur
M. Jaroslav BRUZEK, Directeur de Recherche émérite au CNRS, Bordeaux	Invité

L'estimation du délai *post mortem* est une étape fondamentale en anthropologie médico-légale. À ce jour, peu de méthodes précises et fiables existent. Les objectifs de notre travail étaient d'étudier le tissu osseux et son évolution dans les années et siècles suivant le décès en développant la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) des solides du carbone ^{13}C et du proton ^1H . Nous avons analysé une centaine d'os humains et animaux pour lesquels nous connaissions l'âge au décès, le sexe, la date de décès et les conditions de conservation. Nous avons caractérisé les os au niveau moléculaire en identifiant le collagène, les lipides et l'hydroxyapatite constitutifs du tissu osseux. Nous avons développé une méthode RMN permettant de distinguer des altérations de certains échantillons attestant de la présence d'adipocire au sein du tissu osseux, ou des dégradations sur des échantillons très anciens. L'étude de l'âge au décès et du sexe des sujets n'a pas mis en évidence une grande influence de ces facteurs sur les données RMN même si, pour des délais *post mortem* de 0 ou 1 an, les sujets féminins présentent quantitativement plus de lipides que les sujets masculins. L'analyse des conditions de conservation des individus montre un développement plus important d'adipocire pour les os laissés à l'air libre comparés aux os enterrés. Enfin, nous rapportons une décroissance quantitative du collagène et des lipides présents au sein du tissu osseux lorsque l'intervalle *post mortem* augmente. Cette décroissance est beaucoup plus rapide pour les lipides (quelques années) que pour le collagène (plusieurs millénaires) alors que l'hydroxyapatite présente une relative stabilité dans les premiers siècles suivant le décès.

Mots clés : Anthropologie médico-légale, Résonance Magnétique Nucléaire des solides, Estimation de l'intervalle *post mortem*, os, collagène de type I, lipides, hydroxyapatite.

THE CONTRIBUTION OF SOLID-STATE NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE TO THE CHEMICAL
CHARACTERIZATION AND TO THE BONE DATATION IN FORENSIC ANTHROPOLOGY

The *post mortem* interval estimation is a fundamental step in forensic anthropology and up to now there are little accurate and reliable methods to do so. The objectives of our study were to investigate the bone composition and its evolution over years and centuries following the death by developing carbon ^{13}C and proton ^1H solid-state nuclear magnetic resonance (NMR). We analyzed about one hundred human and animal bones for which the age at death, sex, date of death and the storage conditions were known. Bones were characterized at the molecular level by identification of collagen, lipids and hydroxyapatite embedded in the bone matrix. We have designed a NMR-based method that allows determining alterations on some samples, evidencing the presence of adipocere (bone wax) within the bone, or finding bone tissue deterioration on some very old samples. Subject age at death and sex did not reveal significant changes on NMR data, except for *post mortem* interval ranging between 0 to 1 year, where female subjects had quantitatively more lipids in their bones than males. Storage conditions may promote a greater development of adipocere especially for bones left in the open air compared to those buried. Finally, we report a quantitative decrease of collagen and lipids present in the bone tissue when the *post mortem* interval increases. This decrease is much faster for lipids than for collagen whereas the hydroxyapatite has a relative stability in the first centuries after the death. Decreases occur with very different time constants, ranging from years to millennia.

Keywords: Forensic anthropology, Solid-state Nuclear Magnetic Resonance, *post mortem* interval estimation, type 1 collagen, lipids, hydroxyapatite.

Thèse effectuée au sein de l'UMR 5199 PACEA, CNRS, Équipe A3P, Université de Bordeaux, Allée Geoffroy Saint Hilaire, CS 50023, 33615 Pessac Cedex, France et au sein de l'UMR 5248 CBMN (Institut de Chimie et de Biologie des Membranes et Nano-objets), CNRS, Université de Bordeaux, Institut Polytechnique de Bordeaux, Allée Geoffroy Saint Hilaire, 33600 Pessac, France

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations.....	11
Liste des figures	13
Liste des tableaux	21
Liste des annexes	25
Introduction	29

PREMIERE PARTIE – De l’os à l’estimation de l’intervalle *post mortem*

1. Le tissu osseux.....	33
1.1. Fonctions et anatomie	33
1.1.1. Fonctions	33
1.1.2. Anatomie	34
1.1.2.1. Organisation macroscopique.....	34
1.1.2.2. Types d’os.....	35
1.1.2.3. Organisation microscopique	36
1.2. Composition.....	39
1.2.1. La matrice extra-cellulaire.....	39
1.2.1.1. Phase organique	39
1.2.1.2. Phase minérale	43
1.2.1.3. Eau	45
1.2.2. Les cellules	45
2. La dégradation du cadavre et du tissu osseux après la mort	46
2.1. Définitions	47
2.2. L’autolyse.....	48
2.3. La putréfaction.....	49
2.3.1. Facteurs influençant l’autolyse et la putréfaction	49
2.3.1.1. La température	50
2.3.1.2. L’eau	50
2.3.1.3. Le pH	51
2.3.1.4. La pression partielle en oxygène.....	52
2.3.1.5. Paramètres propres aux individus	52
2.3.2. Ordre de décomposition tissulaire	52
2.4. Les conditions de décomposition	53
2.4.1. Corps exposés à l’air libre	53
2.4.2. Corps enterrés	54
2.4.3. Corps submergés et immergés	56
2.4.4. Cas particulier des phénomènes de momification et d’adipocire	56
2.5. La squelettisation	57
2.6. La diagenèse	58
2.6.1. Définition.....	58
2.6.2. Processus	59
2.6.3. Facteurs influençant la diagenèse	60
2.6.4. Contamination	60
3. L’estimation du délai <i>post mortem</i>	61
3.1. Estimation des phases récentes de l’intervalle <i>post mortem</i>	61
3.1.1. <i>Algor mortis</i>	62
3.1.2. La rigidité cadavérique ou <i>rigor mortis</i>	62
3.1.3. Les lividités cadavériques ou <i>livor mortis</i>	63

3.1.4. Changements ophtalmologiques.....	64
3.1.5. Changements biochimiques et hématologiques.....	64
3.1.6. Dégradation de l'ADN et changements ultrastructuraux.....	65
3.1.7. Changements morphologiques.....	65
3.1.8. Méthodes entomologiques.....	66
3.1.9. Synthèse sur l'estimation des intervalles <i>post mortem</i> courts	66
3.2. Estimation des phases tardives de l'intervalle <i>post mortem</i>.....	66
3.2.1. Datation des indices et matériels associés au corps	67
3.2.1.1. Indices botaniques.....	67
3.2.1.2. Structures de recouvrement et artéfacts associés	68
3.2.2. Méthodes spécifiques à l'os.....	69
3.2.2.1. Observation de critères macroscopiques.....	69
3.2.2.2. Observation de critères microscopiques.....	69
3.2.2.3. Méthodes analytiques	70
3.2.3. Synthèse sur les méthodes d'estimation de l'intervalle <i>post mortem</i> à partir de restes osseux squelettiques	78
3.2.4. Limites des méthodes existantes.....	78
3.2.5. Nécessité de mettre au point une nouvelle méthode d'estimation de l'intervalle <i>post mortem</i>	79
3.2.5.1. Jurisprudence actuelle en matière de méthodologie appliquée à la criminalistique.....	79
3.2.5.2. Prérequis méthodologique et matériel.....	81

DEUXIEME PARTIE – Le statut juridique du corps humain dans la recherche scientifique en France

1. Définitions juridiques.....	87
1.1. Le corps humain, ses éléments et ses produits.....	87
1.2. Les différents consentements	88
1.3. La mort	90
1.4. Le cadavre.....	91
1.5. Les prélèvements	91
1.6. Les scellés biologiques.....	92
1.7. La recherche scientifique.....	92
1.8. Déontologie et éthique.....	93
2. Quels matériels utiliser ?	94
2.1. Respect des principes déontologiques et éthiques	94
2.2. Centre de Don des corps.....	95
2.3. Corps conservés dans les instituts médico-légaux.....	97
2.4. Les collections de référence	98
2.5. Les déchets d'activité de soins.....	99
2.6. Les scellés judiciaires biologiques.....	100
2.7. Devenir des individus issus des fins de concession de cimetières.....	101
3. Conclusions	101

TROISIEME PARTIE – De l'atome à la molécule : Introduction à la spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire

1. Propriétés magnétiques des noyaux atomiques	105
2. Excitation des noyaux de spin $\frac{1}{2}$	106
3. La détection du signal RMN.....	109
3.1. Le spectromètre.....	109
3.2. Le phénomène de résonance.....	110
3.3. La relaxation.....	111

3.4. La transformée de Fourier	112
3.5. Répétition et traitement du signal	114
4. Les interactions internes et l'interprétation des spectres	114
4.1. Le déplacement chimique.....	114
4.2. Les interactions dipolaires magnétiques	115
4.2.1. Couplage direct.....	115
4.2.2. Couplage indirect, scalaire ou J	115
4.2.3. L'interaction quadripolaire	116
5. RMN des liquides et des solides	116
6. Spécificités de la spectroscopie de RMN du carbone-13.....	118

QUATRIEME PARTIE – Matériels et méthodes

Chapitre 4.1 – Collections ostéologiques étudiées et matériels consommables utilisés

1. Os humains de différents délais <i>post mortem</i>	123
1.1. Collection Simon (Genève, Suisse).....	123
1.2. Collection Inrap Grand Est nord (Metz, France)	125
1.3. Collection du Muséum National de Prague (République tchèque).....	126
1.4. Prélèvements conservés à l'Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie Nationale (Rosny-sous-Bois, France)	128
1.5. Prélèvements réalisés à l'École de Chirurgie de Paris (France)	129
1.6. Collections du Laboratoire d'Anatomie de l'Université Libre de Bruxelles et de l'Institut royal des Sciences naturelles de Belgique (Bruxelles, Belgique).....	130
1.7. Collection de Milan (Italie).....	132
1.8. Os d'intérêt archéologique	133
2. Os expérimentaux : <i>Sus scrofa</i>	134
3. Matériels et produits consommables	135

Chapitre 4.2 – Préparation des échantillons osseux et séquences d'acquisition en RMN

1. Protocole de prélèvements	137
1.1. Prélèvements.....	137
1.1.1. Protocole pour des prélèvements sur os secs	137
1.1.2. Protocole pour des prélèvements sur cadavre.....	138
1.1.3. Os déjà échantillonnés	139
1.2. Nettoyage mécanique	139
1.3. Conditionnement.....	139
2. Protocole de broyage	139
3. Préparation des échantillons en vue des analyses de spectroscopie RMN.....	140
3.1. En spectroscopie RMN des solides	140
3.1.1. Le contenant : Rotor	140
3.1.2. Pesée	141
3.1.3. Lyophilisation.....	141
3.1.4. Base de données.....	142
3.1.5. Cas particulier de l'analyse d'un échantillon de Minigrip®.....	142
3.2. En spectroscopie RMN des liquides	142
4. Spectromètre RMN et séquences d'acquisition	143
4.1. Les spectromètres.....	143
4.2. Les séquences d'acquisition en RMN des solides	143
4.2.1. RMN du proton.....	143

4.2.2. RMN du carbone-13	145
4.2.3. RMN du phosphore-31	146
4.3. Les séquences d'acquisition en RMN des liquides	146
4.3.1. RMN du proton.....	146
4.3.2. RMN du carbone-13	147

Chapitre 4.3 – Traitement statistique des données

1. Mesure de l'erreur expérimentale	149
2. Tests statistiques.....	150

CINQUIEME PARTIE – Résultats

Chapitre 5.1 – Validation méthodologique du protocole d'étude d'échantillons osseux par RMN

1. Identification spectrale des constituants du tissu osseux.....	155
1.1. Analyse en RMN du carbone-13.....	155
1.1.1. Matière organique.....	155
1.1.2. Matière minérale.....	163
1.1.3. Synthèse.....	163
1.2. Analyse en RMN du proton.....	164
1.2.1. Matière organique.....	164
1.2.2. Matière minérale.....	166
1.2.3. Synthèse.....	166
1.3. Analyse en RMN du phosphore-31.....	168
1.3.1. Matière organique.....	168
1.3.2. Matière minérale.....	168
1.3.3. Synthèse.....	169
2. Détermination de l'erreur expérimentale	169
3. Normalisation des échantillons par la masse	171
3.1. Analyse en RMN du proton.....	171
3.2. Analyse en RMN du carbone-13.....	175
4. Effet de la lyophilisation des échantillons sur la résolution spectrale	179
4.1. Analyse en RMN du proton.....	180
4.2. Analyse en RMN du carbone-13.....	186
5. Optimisation des paramètres d'acquisition en RMN des solides du carbone-13	193
5.1. Optimisation du délai de retour à l'équilibre de l'aimantation D_1 entre deux acquisitions.....	193
5.2. Optimisation du temps de contact τ_c	195
5.2.1. Principe	195
5.2.2. Protocole.....	196
5.2.3. Résultats.....	197
5.2.3.1. Résultats de l'optimisation sur un os récent.....	198
5.2.3.2. Comparaison entre tous les échantillons et synthèse de l'optimisation du temps de contact.....	206
5.2.3.3. Synthèse de l'optimisation du temps de contact	210
6. Confrontation de nos résultats aux données issues de la littérature.....	213

Chapitre 5.2 – Altération et dégradation des échantillons osseux

1. Mise en évidence spectrale des modifications et des altérations du tissu osseux.....	217
2. Discussion.....	222
2.1. Méthode d'identification des altérations et dégradations du tissu osseux	222
2.2. Hypothèse d'identification des agents potentiels responsables de l'altération du tissu osseux	223
2.2.1. Altérations d'origine anthropique.....	223
2.2.2. Altérations d'origine taphonomique	225
2.3. Synthèse et discussion sur les altérations et les dégradations du tissu osseux	229

Chapitre 5.3 – Variations intra-individuelles et inter-individuelles des constituants du tissu osseux

1. Variations intra-individuelles.....	235
1.1. Variation entre deux os de même nature du même individu	235
1.2. Variations entre différents os du même individu	237
1.3. Synthèse sur les variations intra-individuelles	246
2. Variations inter-individuelles.....	247
2.1. Étude par RMN du carbone-13 des sous échantillons des collections BRUULB, IRCGN et Milan	247
2.1.1. Analyse des spectres	247
2.1.2. Analyse des aires spectrales.....	249
2.1.3. Analyse des intensités spectrales	252
2.2. Analyses en RMN du proton	258
2.2.1. Analyse des spectres	258
2.2.2. Analyse des aires spectrales.....	259
2.2.3. Analyse des intensités spectrales	261
3. Synthèse et discussion sur les variations intra et inter-individuelles des constituants du tissu osseux	266

Chapitre 5.4 – Influence de l'intervalle *post mortem* et des conditions de conservation sur les constituants du tissu osseux

1. Influence de l'intervalle <i>post mortem</i>	269
1.1. Sur notre collection globale.....	269
1.1.1. Analyse en RMN du carbone-13	270
1.1.1.1. Variation des aires spectrales.....	273
1.1.1.2. Variation des intensités spectrales	276
1.1.2. Analyse en RMN du proton	280
1.1.2.1. Variation des aires spectrales.....	283
1.1.2.2. Variation des intensités spectrales	284
1.1.3. Synthèse des observations sur notre collection globale.....	288
1.2. Analyse sur les échantillons non altérés.....	289
1.2.1. Analyse en RMN du carbone-13	290
1.2.1.1. Analyse de la variation des aires spectrales	292
1.2.1.2. Analyse de la variation des intensités spectrales.....	295
1.2.1.3. Synthèse des analyses sur les individus non altérés.....	299
1.2.2. Analyse en RMN du proton	299
1.2.2.1. Analyse de la variation des aires spectrales	302
1.2.2.2. Variation des intensités spectrales	303
1.2.3. Synthèse des analyses sur les individus non altérés	306
1.2.4. Interprétations statistiques	306

1.3. Analyse sur les échantillons altérés par une transformation adipocireuse.....	308
1.3.1. Analyse en RMN du carbone-13	308
1.3.2. Analyse en RMN du proton	312
1.3.3. Synthèse des observations de notre collection d'individus altérés	315
1.4. Synthèse sur l'influence de l'intervalle <i>post mortem</i>	316
2. Influence des conditions de conservation	316
2.1. Analyse sur notre collection globale	316
2.2. Analyse des échantillons expérimentaux d'os de faune	320
2.2.1. Analyse en RMN du carbone-13	321
2.2.2. Analyse en RMN du proton	324
2.2.3. Synthèse des observations sur nos échantillons expérimentaux	328
 SIXIEME PARTIE – Synthèse et discussion	
1. Validation du protocole d'étude du tissu osseux par spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire des solides, en rotation à l'angle magique (MAS).....	333
2. Contamination, altération et dégradation du tissu osseux : Influence des conditions de conservation sur le tissu osseux.....	335
3. Variations intra et inter-individuelles des constituants du tissu osseux.....	336
4. Influence de l'intervalle <i>post mortem</i> sur le tissu osseux.....	338
5. Place de la Résonance Magnétique Nucléaire des solides parmi les méthodes d'estimation de l'intervalle <i>post mortem</i>	341
 Conclusions - Perspectives.....	347
 Bibliographie.....	353

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADP : Adénosine diphosphate
Ala : Alanine
ATP : Adénosine triphosphate
Arg : Arginine
ARN : Acide ribonucléique
Asp : Asparagine
C. civ. : Code civil
C. pén. : Code pénal
C. pr. pén. : Code de procédure pénale
C. santé publ. : Code de la santé publique
CCNE : Comité Consultatif National d'Éthique
CGCT : Code général des collectivités territoriales
CPMAS : « Cross polarization at magic angle spinning » ou polarisation croisée en rotation à l'angle magique
Crim. : Chambre criminelle de la Cour de cassation
Cys : Cystéine
DPM : Délai *post mortem*
FID : « Free Induction Decay » ou signal de précession libre
GAGs : Glycoaminoglycans
Gln : Glutamine
Glu : Acide glutamique
Gly : Glycine
His : Histidine
Hyp : Hydroxyproline
Ile : Isoleucine
Inrap : Institut national de recherches archéologiques préventives
IRCGN : Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie Nationale
Leu : Leucine
Lys : Lysine
MAS : « Magic Angle Spinning » ou rotation à l'angle magique
Met : Méthionine
PACEA : Laboratoire « de la Préhistoire à l'Actuel : Culture, Environnement et Anthropologie »
Phe : Phénylalanine
PNC : Protéines non collagéniques
ppm : Partie par million
Pro : Proline
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
Sec : Sélénocystéine
Ser : Sérine
Thr : Thréonine
TI : Temps d'inversion
Trp : Tryptophane
Tyr : Tyrosine
Val : Valine

LISTE DES FIGURES

Figure 1 – Coupe d'un fémur gauche mettant en évidence l'os trabéculaire et l'os cortical	34
Figure 2 – Exemple d'un os long (fémur droit)	35
Figure 3 – Exemples d'os courts.....	36
Figure 4 – Exemples d'os plats.....	36
Figure 5 – Organisation hiérarchique de l'os	37
Figure 6 – Schéma d'un os long montrant l'os cortical et l'os trabéculaire	38
Figure 7 – Composition d'une fibre de collagène.....	42
Figure 8 – Molécule d'hydroxyapatite stœchiométrique	44
Figure 9 – Étapes de la décomposition d'un cadavre	47
Figure 10 – Sépulture d'un soldat de la Première Guerre mondiale inhumé directement en pleine terre.....	55
Figure 11 – Lividités cadavériques	64
Figure 12 – Exemples d'os de différents intervalles <i>post mortem</i> colorés au bleu de Nil.....	71
Figure 13 – Courbe de décroissance radioactive du carbone-14.....	75
Figure 14 – Levée de dégénérescence et états énergétiques, E_α , E_β , en présence d'un champ magnétique B_0	107
Figure 15 – Orientation des noyaux de spins $\frac{1}{2}$ en fonction du champ magnétique d'intensité B_0 , et aimantation résultante M	108
Figure 16 – Proton en précession dans un champ magnétique d'intensité B_0	108
Figure 17 – Schéma simplifié d'un spectromètre de résonance magnétique nucléaire	110
Figure 18 – Retour à l'équilibre de l'aimantation M_0 après arrêt de l'application du champ B_1	111
Figure 19 – Retour à l'état d'équilibre de l'aimantation selon M_z (relaxation longitudinale T_1) et selon M_y (relaxation transversale T_2)	112
Figure 20 – Signal enregistré (FID) au cours d'une acquisition en RMN du carbone-13 de la glycine et représentation spectrale après transformée de Fourier	113
Figure 21 – Relation entre le blindage électronique (σ) et le déplacement chimique (δ)	113
Figure 22 – Couplage scalaire hétéronucléaire à une liaison ($^1J_{C-H}$) et homonucléaire à trois liaisons ($^3J_{H-H}$)	116
Figure 23 – Rotation à l'angle magique (MAS).....	117
Figure 24 – Spectres obtenus en RMN du phosphore-31 d'un échantillon de dent.....	118
Figure 25 – Photographie de l'individu PRG342/94 avant et après échantillonnage	127
Figure 26 – Prélèvement réalisé sur un os de la collection Milan.....	133
Figure 27 – Exemple d'un trépan diamanté et de l'échantillon osseux obtenu.....	138
Figure 28 – Broyeur MM 400 et bol de 10 ml en carbure de tungstène (Retsch®).....	140
Figure 29 – Rotor et bouchon MAS de 4 mm de diamètre	141
Figure 30 – Séquence d'acquisition en RMN du proton.....	144
Figure 31 – Séquence d'acquisition en RMN du carbone-13	145
Figure 32 – Spectre d'un échantillon de glycine cristalline obtenu en RMN du carbone-13	150
Figure 33 – Exemple de dénomination des différents atomes de carbone au sein d'un acide aminé : l'alanine	156
Figure 34 – Spectre obtenu en RMN du carbone-13 de l'échantillon EC12-2652 non lyophilisé et attribution des pics de résonance des acides aminés contenus dans le collagène	156
Figure 35 – Exemples de composition des lipides	158
Figure 36 – Spectre obtenu en RMN du carbone-13 de l'échantillon EC12-2652 non lyophilisé et attribution des pics de résonance des lipides contenus dans le tissu osseux	159
Figure 37 – Formules semi développées du citrate monohydrate (gauche) et du citrate osseux (droite).....	160

Figure 38 – Spectre obtenu en RMN du carbone-13 de l'échantillon EC12-2652 non lyophilisé et attribution des pics de résonance du citrate contenu dans le tissu osseux.....	161
Figure 39 – Spectres RMN CPMAS du carbone-13 de l'individu EC12-2693 avec une vitesse de rotation de 10 kHz (haut) et une vitesse de rotation de 8 kHz (bas)	162
Figure 40 – Spectre obtenu en RMN du carbone-13 de l'échantillon EC12-2652 non lyophilisé et attribution des pics de résonance précédemment identifiés	163
Figure 41 – Spectre obtenu en RMN du proton de l'échantillon EC12-2652 après lyophilisation et attribution des pics de résonance précédemment identifiés	167
Figure 42 – Spectre obtenu en RMN du proton de l'échantillon EC12-2652 après lyophilisation et ses bandes de rotation.....	167
Figure 43 – Spectre obtenu en RMN du phosphore-31 de l'échantillon IRCGN-19 non lyophilisé	169
Figure 44 – Spectres RMN du proton de 5 sujets provenant de milieux de conservation différents et ayant des délais <i>post mortem</i> différents	172
Figure 45 – Superposition des spectres RMN du proton de 5 sujets provenant de milieux de conservation différents et ayant des délais <i>post mortem</i> différents.....	173
Figure 46 – Spectres RMN du proton de 5 sujets provenant de milieux de conservation différents et ayant des délais <i>post mortem</i> différents, après normalisation de leur masse à 100 mg ..	174
Figure 47 – Superposition des spectres RMN du proton de 5 sujets provenant de milieux de conservation différents et ayant des délais <i>post mortem</i> différents, après normalisation de leur masse à 100 mg	175
Figure 48 – Spectres RMN du carbone-13 de 5 sujets provenant de milieux de conservation différents et ayant des délais <i>post mortem</i> différents	176
Figure 49 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 de 5 sujets provenant de milieux de conservation différents et ayant des délais <i>post mortem</i> différents.....	177
Figure 50 – Spectres RMN du carbone-13 de 5 sujets provenant de milieux de conservation différents et ayant des délais <i>post mortem</i> différents, après normalisation de leur masse à 100 mg.....	178
Figure 51 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 de 5 sujets provenant de milieux de conservation différents et ayant des délais <i>post mortem</i> différents, après normalisation de leur masse à 100 mg	179
Figure 52 – Spectres RMN du proton de 3 sujets après lyophilisation et après normalisation de leur masse sèche à 100 mg	181
Figure 53 – Superposition des spectres RMN du proton de 3 sujets après lyophilisation et après normalisation de leur masse sèche à 100 mg	182
Figure 54 – Superposition des spectres RMN du proton du sujet EC12-2693 avant et après lyophilisation et après normalisation de sa masse sèche à 100 mg.....	183
Figure 55 – Superposition des spectres RMN du proton du sujet IRCGN-01 avant et après lyophilisation et après normalisation de sa masse sèche à 100 mg.....	184
Figure 56 – Superposition des spectres RMN du proton du sujet Simon AIG-10 avant et après lyophilisation et après normalisation de sa masse sèche à 100 mg.....	184
Figure 57 – Séquence d'acquisition expliquant la perte de signal due à un effet de T_2	185
Figure 58 – Spectres RMN du carbone-13 de 3 sujets après lyophilisation et après normalisation de leur masse sèche à 100 mg	187
Figure 59 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 de 3 sujets après lyophilisation et après normalisation de leur masse sèche à 100 mg.....	187
Figure 60 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 du sujet EC12-2693 avant et après lyophilisation et après normalisation de sa masse à 100 mg.....	188
Figure 61 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 du sujet IRCGN-01 avant et après lyophilisation et après normalisation de sa masse à 100 mg.....	189

Figure 62 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 du sujet Simon AIG-10 avant et après lyophilisation et après normalisation de sa masse à 100 mg	190
Figure 63 – Spectres RMN du carbone-13 de 5 sujets provenant de milieux de conservation différents et ayant des délais <i>post mortem</i> différents, après normalisation de leur masse à 100 mg.....	192
Figure 64 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 de 5 sujets provenant de milieux de conservation différents et ayant des délais <i>post mortem</i> différents, après normalisation de leur masse à 100 mg	193
Figure 65 – Séquence d’Inversion Récupération permettant la détermination du délai de retour à l’équilibre de l’aimantation D_1 à l’aide de l’équation de retour à l’équilibre	194
Figure 66 – Exemple de variation de l’intensité spectrale en fonction du temps de contact d’un échantillon osseux en RMN du carbone-13	195
Figure 67 – Paramètres quantifiés en vue de l’optimisation de la séquence d’acquisition CPMAS en RMN du carbone-13 sur un échantillon osseux	196
Figure 68 – Variation de l’intensité spectrale des différents pics des chaînes aliphatiques utilisés pour l’optimisation du temps de contact sur l’échantillon EC12-2693, en fonction du temps de contact, en valeur absolue.....	199
Figure 69 – Variation de l’intensité spectrale des différents pics des groupes carboxyle utilisés pour l’optimisation du temps de contact sur l’échantillon EC12-2693, en fonction du temps de contact, en valeur absolue.....	200
Figure 70 – Variation de l’intensité spectrale des différents pics des chaînes aliphatiques utilisés pour l’optimisation du temps de contact sur l’échantillon EC12-2693, en fonction du temps de contact, en valeur relative.....	201
Figure 71 – Variation de l’intensité spectrale des différents pics des groupes carboxyle utilisés pour l’optimisation du temps de contact sur l’échantillon EC12-2693, en fonction du temps de contact, en valeur relative.....	202
Figure 72 – Variation de la moyenne des intensités spectrales des différents pics des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle utilisés pour l’optimisation du temps de contact sur l’échantillon EC12-2693, en fonction du temps de contact, en valeur relative moyenne...	203
Figure 73 – Variation de l’aire des massifs des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle de l’échantillon EC12-2693, en fonction du temps de contact, en valeur absolue	204
Figure 74 – Variation de l’aire des massifs des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle de l’échantillon EC12-2693, en fonction du temps de contact, en valeur relative	205
Figure 75 – Variation de la moyenne des intensités des chaînes aliphatiques des 13 individus (16 échantillons) utilisés pour l’optimisation du temps de contact, en fonction du temps de contact, en valeur relative moyenne	207
Figure 76 – Variation de la moyenne des intensités des groupes carboxyle des 13 individus (16 échantillons) utilisés pour l’optimisation du temps de contact, en fonction du temps de contact, en valeur relative moyenne	208
Figure 77 – Variation de l’aire du massif correspondant aux chaînes aliphatiques des 13 individus (16 échantillons) utilisés pour l’optimisation du temps de contact, en fonction du temps de contact, en valeur relative moyenne.....	209
Figure 78 – Variation de l’aire du massif correspondant aux groupes carboxyle des 13 individus (16 échantillons) utilisés pour l’optimisation du temps de contact, en fonction du temps de contact, en valeur relative moyenne	210
Figure 79 – Variation de la moyenne des intensités spectrales obtenue pour les chaînes aliphatiques et pour les groupes carboxyle de tous les échantillons, en fonction du temps de contact, en valeur moyenne relative	211
Figure 80 – Variation de la moyenne des aires des massifs des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle de tous les échantillons confondus, en fonction du temps de contact, en valeur relative moyenne	211

Figure 81 – Comparaison des intensités spectrales obtenues en RMN du carbone-13 sur un échantillon d'os pour des temps de contact de 0,3 ms ; 1,5 ms et 2 ms	212
Figure 82 – Spectres RMN CPMAS du carbone-13 d'os cortical humain et de collagène de type I (d'après Kolodziejski 2004)	213
Figure 83 – Exemple de spectres RMN du carbone-13 présentant une altération	218
Figure 84 – Représentation graphique du rapport entre l'aire des chaînes aliphatiques et celle des groupes carboxyle ou ratio ALICO de tous les échantillons étudiés permettant de mettre en évidence les os altérés	220
Figure 85 – Spectre RMN du carbone-13 de l'échantillon SAterre13 présentant une faible modification de son profil spectral	221
Figure 86 – Spectre RMN du carbone-13 de l'échantillon PRG596/95 présentant un épaulement sur un pic indiquant une altération	222
Figure 87 – Spectre RMN des liquides du carbone-13 du Dettol®	224
Figure 88 – Spectre RMN du carbone-13 de Minigrip®	225
Figure 89 – Spectre RMN du carbone-13 de pupes de <i>Calliphora vicina</i>	226
Figure 90 – Modèle de la structure de l'acide humique	227
Figure 91 – Spectres RMN du carbone-13 d'acide fulvique laurentian (LFA) et d'acide humique laurentian (LHA)	227
Figure 92 – Exemple de spectres RMN du proton des échantillons présentant une altération mise en évidence en RMN du carbone-13	229
Figure 93 – Comparaison des spectres RMN du carbone-13 obtenus à partir des fémurs (droit vs. gauche) et des tibias (droit vs. gauche) de l'individu MV-6 (Inrap Grand Est nord)	235
Figure 94 – Comparaison des spectres RMN du proton obtenus à partir des fémurs (droit vs. gauche) et des tibias (droit vs. gauche) de l'individu MV-6 (Inrap Grand Est nord)	236
Figure 95 – Comparaison des spectres obtenus en RMN du carbone-13 à partir des fémur et tibia droits de l'individu MV-6 (Inrap Grand Est nord)	238
Figure 96 – Comparaison des spectres obtenus en RMN du proton à partir des fémur et tibia droits de l'individu MV-6 (Inrap Grand Est nord)	239
Figure 97 – Comparaison des spectres obtenus en RMN du carbone-13 à partir de l'humérus, des vertèbres cervicale et lombaires de l'individu MV-13 (Inrap Grand Est nord)	239
Figure 98 – Comparaison des spectres obtenus en RMN du proton à partir de l'humérus, des vertèbres cervicale et lombaires de l'individu MV-13 (Inrap Grand Est nord)	240
Figure 99 – Comparaison des spectres obtenus en RMN du carbone-13 à partir du fémur, tibia, humérus droits et d'une côte de l'individu Sorbey-1 (Inrap Grand Est nord)	241
Figure 100 – Comparaison des spectres obtenus en RMN du proton à partir du fémur, tibia, humérus droits et d'une côte de l'individu Sorbey-1 (Inrap Grand Est nord)	242
Figure 101 – Diagramme en barres représentant l'aire des chaînes aliphatiques obtenue en RMN du carbone-13 de différents os des individus MV-6, MV-13 et Sorbey-1 (Inrap Grand Est nord)	244
Figure 102 – Diagramme en barres représentant l'aire des groupes carboxyle obtenue en RMN du carbone-13 de différents os des individus MV-6, MV-13 et Sorbey-1 (Inrap Grand Est nord)	245
Figure 103 – Diagramme en barres représentant l'aire obtenue en RMN du proton de différents os des individus MV-6, MV-13 et Sorbey-1 (Inrap Grand Est nord)	246
Figure 104 – Spectres RMN du carbone-13 des 16 individus de la collection BRU-ULB utilisés pour l'étude de l'influence des facteurs « âge au décès » et « sexe »	249
Figure 105 – Représentation graphique des aires des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle obtenues en RMN du carbone-13 en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection BRUULB (n = 16)	249

Figure 106 – Représentation graphique des aires des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle obtenues en RMN du carbone-13 en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection MIL (n = 15)	250
Figure 107 – Représentation graphique des aires des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle obtenues en RMN du carbone-13 en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection IRCGN (n = 17)	251
Figure 108 – Représentation graphique de l'intensité de 3 pics de résonance obtenus par RMN du carbone-13 en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection BRUULB (n = 16).....	253
Figure 109 – Représentation graphique de l'intensité de 3 pics de résonance obtenus par RMN du carbone-13 en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection MIL (n = 15).....	254
Figure 110 – Représentation graphique de l'intensité de 3 pics de résonance obtenus par RMN du carbone-13 en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection IRCGN (n = 17).....	255
Figure 111 – Spectres RMN du proton des 16 individus de la collection BRU-ULB utilisés pour l'étude de l'influence des facteurs « âge au décès » et « sexe »	259
Figure 112 – Représentation graphique de l'aire obtenue en RMN du proton en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection BRUULB (n = 16)	259
Figure 113 – Représentation graphique de l'aire obtenue en RMN du proton en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection MIL (n = 15)	260
Figure 114 – Représentation graphique de l'aire obtenue en RMN du proton en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection IRCGN (n = 17)	260
Figure 115 – Représentation graphique de l'intensité de 2 pics de résonance obtenue par RMN du proton en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection BRUULB (n = 16).....	262
Figure 116 – Représentation graphique de l'intensité de 2 pics de résonance obtenue par RMN du proton en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection MIL (n = 15).....	262
Figure 117 – Représentation graphique de l'intensité de 2 pics de résonance obtenue par RMN du proton en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection IRCGN (n = 17).....	263
Figure 118 – Diagramme en barres représentant la moyenne de l'intensité spectrale (\pm écart-type) des pics identifiés en RMN du proton pour l'ensemble de la collection, pour les hommes et pour les femmes de la collection BRUULB.....	265
Figure 119 – Spectres RMN du carbone-13 des fémurs de 9 individus appartenant à la collection globale présentant des délais <i>post mortem</i> compris entre 0 et 2000 ans	271
Figure 120 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 des fémurs de 9 individus appartenant à la collection globale présentant des délais <i>post mortem</i> compris entre 0 et 2000 ans.....	272
Figure 121 – Représentation graphique de l'aire des chaînes aliphatiques des individus de la collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	274
Figure 122 – Représentation graphique de l'aire des groupes carboxyle des individus de la collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	275
Figure 123 – Représentation graphique de l'intensité du Ca de la glycine (résonnant entre 42,7 et 43,3 ppm) des individus de notre collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	277
Figure 124 – Représentation graphique de l'intensité du C β de la proline, du C β de l'arginine et des groupes méthylène CH $_2$ des lipides (résonnant entre 29,1 et 30,5 ppm) des individus de	

notre collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	278
Figure 125 – Représentation graphique de l'intensité du pic le plus intense des groupes carboxyle (résonnant vers 173 ppm) des individus de notre collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	279
Figure 126 – Spectres RMN du proton des fémurs de 9 individus appartenant à la collection globale présentant des délais <i>post mortem</i> compris entre 0 et 2000 ans	281
Figure 127 – Superposition des spectres RMN du proton de 9 individus appartenant à la collection globale présentant des délais <i>post mortem</i> de 0 à 2000 ans	282
Figure 128 – Représentation graphique de l'aire mesurée en RMN du proton des individus de notre collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	283
Figure 129 – Représentation graphique de l'intensité des groupes méthylène (CH ₂) _n des acides gras des lipides (résonnant entre 1,20 et 1,43 ppm) des individus de notre collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du proton en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	285
Figure 130 – Représentation graphique de l'intensité des groupes méthine –CH=CH– des acides gras des lipides (résonnant entre 5,30 et 5,80 ppm) des individus de notre collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du proton en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	286
Figure 131 – Représentation graphique de l'intensité des groupes hydroxyle de l'hydroxyapatite (résonnant entre 0,10 et 0,20 ppm) des individus de notre collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du proton en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	287
Figure 132 – Spectres RMN du carbone-13 des fémurs de 9 individus non altérés présentant des délais <i>post mortem</i> compris entre 0 et 2000 ans.....	290
Figure 133 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 des fémurs de 9 individus non altérés présentant des délais <i>post mortem</i> compris entre 0 et 2000 ans	291
Figure 134 – Représentation graphique de l'aire des chaînes aliphatiques des individus non altérés pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	293
Figure 135 – Représentation graphique de l'aire des groupes carboxyle de tous les individus non altérés pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	294
Figure 136 – Représentation graphique de l'intensité du C α de la glycine (résonnant entre 42,7 et 43,3 ppm) des individus non altérés pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	296
Figure 137 – Représentation graphique de l'intensité du C β de la proline, du C β de l'arginine et des groupes méthylène CH ₂ des lipides (résonnant entre 29,1 et 30,5 ppm) des individus non altérés pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	297
Figure 138 – Représentation graphique de l'intensité du pic le plus intense des groupes carboxyle (résonnant vers 173 ppm) des individus non altérés pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	298
Figure 139 – Spectres RMN du proton de 9 individus non altérés présentant des délais <i>post mortem</i> de 0 à 2000 ans.....	300
Figure 140 – Superposition des spectres RMN du proton de 9 individus non altérés présentant des délais <i>post mortem</i> de 0 à 2000 ans	301
Figure 141 – Représentation graphique de l'aire mesurée en RMN du proton de tous les individus non altérés pour lesquels nous possédons un fémur en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	302

Figure 142 – Représentation graphique de l'intensité des groupes méthylène (CH ₂) _n des acides gras des lipides (résonnant entre 1,20 et 1,43 ppm) des individus non altérés pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du proton en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	303
Figure 143 – Représentation graphique de l'intensité des groupes méthine –CH=CH– des acides gras des lipides (résonnant entre 5,30 et 5,80 ppm) des individus non altérés pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du proton en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	304
Figure 144 – Représentation graphique de l'intensité des groupes hydroxyle de l'hydroxyapatite (résonnant entre 0,10 et 0,20 ppm) des individus non altérés pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du proton en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	305
Figure 145 – Spectres RMN du carbone-13 de 7 individus présentant une altération ayant des intervalles <i>post mortem</i> compris entre 11 et 79 ans	309
Figure 146 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 de 7 individus présentant une altération ayant des intervalles <i>post mortem</i> compris entre 11 et 79 ans	310
Figure 147 – Représentation graphique de l'aire des chaînes aliphatiques des individus altérés (n = 12) pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	311
Figure 148 – Représentation graphique de l'aire des groupes carboxyle des individus altérés (n = 12) pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	312
Figure 149 – Spectres RMN du proton de 7 individus présentant une transformation adipocireuse et ayant des intervalles <i>post mortem</i> compris entre 11 et 79 ans	313
Figure 150 – Superposition des spectres RMN du proton de 7 individus présentant une transformation adipocireuse et ayant des intervalles <i>post mortem</i> compris entre 11 et 79 ans	314
Figure 151 – Représentation graphique de l'aire mesurée en RMN du proton de tous les individus altérés de notre collection globale (n = 12) pour lesquels nous possédons un fémur en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	315
Figure 152 – Représentation graphique de l'aire des chaînes aliphatiques des individus de notre collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	317
Figure 153 – Représentation graphique de l'aire des groupes carboxyle des individus de notre collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	318
Figure 154 – Représentation graphique de l'aire mesurée en RMN du proton des individus de notre collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle <i>post mortem</i>	319
Figure 155 – Spectres RMN du carbone-13 d'échantillons expérimentaux de <i>Sus scrofa</i> présentant différentes conditions de conservation et un intervalle <i>post mortem</i> de 1 an	321
Figure 156 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 d'échantillons expérimentaux de <i>Sus scrofa</i> présentant différentes conditions de conservation et un intervalle <i>post mortem</i> de 1 an	322
Figure 157 – Spectres RMN du carbone-13 d'échantillons expérimentaux de <i>Sus scrofa</i> présentant différentes conditions de conservation et un intervalle <i>post mortem</i> de 2 ans ..	323
Figure 158 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 d'échantillons expérimentaux de <i>Sus scrofa</i> présentant différentes conditions de conservation et un intervalle <i>post mortem</i> de 2 ans.....	324
Figure 159 – Spectres RMN du proton d'échantillons expérimentaux de <i>Sus scrofa</i> présentant différentes conditions de conservation et un intervalle <i>post mortem</i> de 1 an	325
Figure 160 – Superposition des spectres RMN du proton d'échantillons expérimentaux de <i>Sus scrofa</i> présentant différentes conditions de conservation et un intervalle <i>post mortem</i> de 1 an	326

Figure 161 – Spectres RMN du proton d'échantillons expérimentaux de <i>Sus scrofa</i> présentant différentes conditions de conservation et un intervalle <i>post mortem</i> de 2 ans	327
Figure 162 – Superposition des spectres RMN du proton d'échantillons expérimentaux de <i>Sus scrofa</i> présentant différentes conditions de conservation et un intervalle <i>post mortem</i> de 2 ans.....	328
Figure 163 – Arbre décisionnel permettant de catégoriser un échantillon en fonction de son intervalle <i>post mortem</i> établi à partir des résultats de notre étude	339

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 – Codage des acides aminés et quantité relative des principaux acides aminés dans le collagène osseux (d’après Ambrose et Norr 1993)	40
Tableau 2 – Catégories, stades de décomposition et estimation de l’intervalle <i>post mortem</i> pour les milieux arides (d’après Galloway et al. 1989).....	54
Tableau 3 – Nombre de spin, fréquence de résonance et abondance naturelle des principaux noyaux étudiés en spectroscopie RMN (d’après Günther 1996 ; Canet et al. 2002 ; Silverstein et al. 2007).....	109
Tableau 4 – Liste des individus échantillonnés de la collection Simon (Genève, Suisse).....	124
Tableau 5 – Liste des individus échantillonnés à l’Inrap Grand Est nord (Metz, France)	125
Tableau 6 – Liste des individus échantillonnés au Muséum National de Prague (République tchèque)	127
Tableau 7 – Liste des individus échantillonnés et conservés au sein de l’Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie Nationale (Rosny-sous-Bois, France).....	128
Tableau 8 – Liste des individus échantillonnés à l’École de Chirurgie (Paris, France)	130
Tableau 9 – Liste des individus échantillonnés au Laboratoire d’Anatomie de l’Université Libre de Bruxelles et de la collection Châtelet (Bruxelles, Belgique).....	130
Tableau 10 – Liste des individus échantillonnés de la Collection Milan (Italie).....	132
Tableau 11 – Liste des individus d’intérêt archéologique (République tchèque, Italie et France)	133
Tableau 12 – Liste des échantillons expérimentaux.....	135
Tableau 13 – Gamme de déplacements chimiques en RMN CPMAS du carbone-13 des principaux acides aminés contenus dans le collagène osseux (d’après Saito et al. 1984 ; Fujisawa et Kuboki 1990 ; Zhu et al. 2009).....	157
Tableau 14 – Gamme de déplacements chimiques en RMN du carbone-13 de trois lipides : phosphatidylcholine, sphingomyéline et cholestérol (d’après Soubias et al. 2004 ; Grélard et al. 2009).....	160
Tableau 15 – Gamme de déplacements chimiques en RMN du carbone-13 des groupes fonctionnels du citrate monohydrate et du citrate osseux (d’après Fischer et al. 1995 ; Hu et al. 2010).....	161
Tableau 16 – Gamme de déplacements chimiques en RMN du proton des principaux acides aminés contenus dans le collagène osseux (d’après Bundi et Wüthrich 1979).....	164
Tableau 17 – Gamme de déplacements chimiques en RMN du proton de trois lipides : phosphatidylcholine, sphingomyéline et cholestérol (d’après Soubias et al. 2004 ; Grélard et al. 2009).....	165
Tableau 18 – Gamme de déplacements chimiques en RMN du proton des lipides (d’après Guillen et Ruiz 2003a, b ; Ren et al. 2008 ; Yeung et al. 2008 ; Grélard et al. 2009)	165
Tableau 19 – Coefficients de variation obtenus pour les mesures de l’intensité et de l’aire des groupes fonctionnels sur un échantillon de glycine en RMN des solides du carbone-13...	170
Tableau 20 – Liste des échantillons choisis pour étudier l’effet de la masse analysée sur les spectres en RMN du proton et du carbone-13.....	171
Tableau 21 – Masse analysée et rapport à appliquer pour obtenir une masse équivalente de 100 mg pour chaque échantillon utilisé pour tester l’influence de la masse sur les aires et intensités spectrales en RMN du proton.....	173
Tableau 22 – Masse analysée et rapport à appliquer pour obtenir une masse de 100 mg pour chaque échantillon utilisé pour tester l’influence de la masse sur les aires et intensités spectrales en RMN du carbone-13	177
Tableau 23 – Masse analysée et facteur correctif de chaque échantillon utilisé pour tester l’effet de la lyophilisation sur la résolution spectrale en RMN du proton.....	180

Tableau 24 – Variations de l'aire spectrale normalisée par la masse du spectre obtenu avant et après lyophilisation en RMN du proton des échantillons EC12-2693, IRCGN-01 et Simon AIG-10	185
Tableau 25 – Masse analysée et facteur correctif de chaque échantillon utilisé pour tester l'effet de la lyophilisation sur la résolution spectrale en RMN du carbone-13	186
Tableau 26 – Variations des aires spectrales normalisées par la masse des groupes carboxyle et des chaînes aliphatiques avant et après lyophilisation de l'échantillon EC12-2693.....	189
Tableau 27 – Variations des aires spectrales normalisées par la masse des groupes carboxyle et des chaînes aliphatiques avant et après lyophilisation de l'échantillon IRCGN-01	190
Tableau 28 – Variations des aires spectrales normalisées par la masse des groupes carboxyle et des chaînes aliphatiques avant et après lyophilisation de l'échantillon Simon AIG-10	191
Tableau 29 – Calcul du facteur correctif permettant de normaliser les échantillons à une masse théorique analysée de 100 mg	192
Tableau 30 – Gamme de déplacements chimiques et attribution des pics de résonance utilisés pour l'optimisation du temps de contact τ_c en RMN CPMAS du carbone-13	197
Tableau 31 – Échantillons utilisés pour l'optimisation du temps de contact τ_c en RMN des solides du carbone-13.....	198
Tableau 32 – Masse analysée et facteur correctif de chaque échantillon utilisé pour l'optimisation du temps de contact τ_c	206
Tableau 33 – Liste des échantillons présentant une modification de leur profil spectral	219
Tableau 34 – Liste des pics étudiés dans le cadre de l'étude des variations intra et inter-individuelles des constituants du tissu osseux en RMN du carbone-13 et en RMN du proton	234
Tableau 35 – Coefficients de variation obtenus à partir des intensités et aire spectrales des fémurs (droit vs. gauche) et des tibias (droit vs. gauche) de l'individu MV-6 (Inrap Grand Est nord).....	237
Tableau 36 – Coefficients de variation obtenus à partir des intensités et aires spectrales de différents os des individus MV-6, MV-13 et Sorbey-1 (Inrap Grand Est nord)	243
Tableau 37 – Résultats des tests de Wilcoxon et de corrélation concernant les aires des groupes carboxyle et des chaînes aliphatiques obtenues par RMN du carbone-13 pour la collection BRUULB, et les sous échantillons des collections MIL et IRCGN.....	252
Tableau 38 – Résultats du test de Wilcoxon concernant les intensités des pics obtenus par RMN du carbone-13 pour la collection BRUULB, et les sous échantillons des collections MIL et IRCGN	256
Tableau 39 – Résultats du test de corrélation concernant les intensités des pics obtenus par RMN du carbone-13 pour la collection BRUULB, et les sous échantillons des collections MIL et IRCGN	257
Tableau 40 – Résultats des tests de Wilcoxon et de corrélation concernant l'aire obtenue en RMN du proton pour la collection BRUULB, et les sous échantillons des collections MIL et IRCGN	261
Tableau 41 – Résultats du test de Wilcoxon concernant les intensités obtenues par RMN du proton pour la collection BRUULB, et les sous échantillons des collections MIL et IRCGN	264
Tableau 42 – Résultats du test de corrélation concernant les intensités obtenues par RMN du proton pour la collection BRUULB, et les sous échantillons des collections MIL et IRCGN	264
Tableau 43 – Effectifs des individus de notre collection globale pour lesquels nous disposons des fémurs par classe d'intervalle <i>post mortem</i>	270
Tableau 44 – Effectifs des individus non altérés pour lesquels nous disposons des fémurs par classe d'intervalle <i>post mortem</i>	289

Tableau 45 – Synthèse des résultats concernant les tests statistiques sur l'influence de l'intervalle <i>post mortem</i> sur les aires et intensités spectrales mesurées, effectués sur les individus non altérés dont l'intervalle <i>post mortem</i> est inférieur à 300 ans.....	307
Tableau 46 – Effectifs des individus altérés pour lesquels nous disposons des fémurs par classe d'intervalle <i>post mortem</i>	308
Tableau 47 – Variation des aires spectrales obtenues en RMN du carbone 13 et du proton, et variation de l'intensité du pic attribuable aux groupes méthylène CH ₂ des lipides en RMN du proton d'échantillons expérimentaux de <i>Sus scrofa</i> en fonction des conditions de conservation et de l'intervalle <i>post mortem</i>	329

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 – Formules chimiques brute et semi développée des principaux acides aminés retrouvés dans le collagène osseux.....	369
Annexe 2 – Notice d'information et formulaire concernant le don de corps à la science à la faculté de médecine de l'Université de Tours	371
Annexe 3 – Notice d'information concernant le don de corps à la science à la faculté de médecine de l'Université d'Aix-Marseille	377
Annexe 4 – Masse analysée et facteur correctif de normalisation par la masse de tous les échantillons analysés pour les acquisitions en RMN du proton avant lyophilisation	381
Annexe 5 – Masse analysée et facteur correctif de normalisation par la masse de tous les échantillons analysés pour les acquisitions en RMN du proton après lyophilisation	387
Annexe 6 – Masse analysée et facteur correctif de normalisation par la masse de tous les échantillons analysés pour les acquisitions en RMN du carbone-13	391
Annexe 7 – Valeurs des intensités spectrales normalisées mesurées en RMN du carbone-13...	397
Annexe 8 – Valeurs des aires spectrales normalisées mesurées en RMN du carbone-13 pour toutes les collections.....	407
Annexe 9 – Valeurs des intensités spectrales normalisées mesurées en RMN du proton pour toutes les collections.....	409
Annexe 10 – Valeurs de l'aire spectrale normalisée mesurée en RMN du proton pour toutes les collections.....	413
Annexe 11 – Spectres RMN du carbone-13 des 15 individus de la collection MIL utilisés pour l'étude de l'influence des facteurs « âge au décès » et « sexe »	415
Annexe 12 – Spectres RMN CPMAS du carbone-13 des 17 individus de la collection IRCGN utilisés pour l'étude de l'influence des facteurs « âge au décès » et « sexe ».....	417
Annexe 13 – Spectres RMN CPMAS du proton des 15 individus de la collection MIL utilisés pour l'étude de l'influence des facteurs « âge au décès » et « sexe »	419
Annexe 14 – Spectres RMN CPMAS du proton des 17 individus de la collection IRCGN utilisés pour l'étude de l'influence des facteurs « âge au décès » et « sexe »	421

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'anthropologie médico-légale fait partie du vaste champ de l'anthropologie biologique au même titre que l'archéo-anthropologie. Ces deux sections étudient l'Homme mais dans des contextes distincts. L'anthropologie médico-légale relève du contexte judiciaire et pose, entre autres, les questions des identités civile et biologique de l'individu (détermination du sexe, estimation de l'âge), de la détermination des causes du décès et de la datation de la mort. Elle s'attache donc le plus souvent à l'étude d'un seul sujet dans un contexte unique. L'archéo-anthropologie étudie aussi l'individu en termes d'identité biologique mais pour le replacer au sein d'un ensemble plus large, la population à laquelle il appartient, et ainsi pour tenter d'appréhender les cultures des populations du passé. Ces « deux anthropologies » partagent leurs buts et leurs méthodes qui sont adaptés aux contextes, et requièrent une approche pluridisciplinaire nécessaire à la compréhension de la problématique dans son ensemble. La datation des restes squelettiques est donc une étape fondamentale pour toute étude anthropologique et c'est sur ce dernier point que ces disciplines divergent. En effet, il est souvent admis que toute datation du décès inférieure à 75-100 ans appartient au domaine médico-légal et tout décès plus ancien relève de l'archéologie ; la limite entre ces deux domaines étant variable selon les pays et les législations. De ce fait, les méthodes de datation en contexte archéologique diffèrent de celles utilisées en anthropologie médico-légale (où on parle plus communément d'estimation de l'intervalle ou du délai *post mortem*) et ne lui sont pas toujours transposables (*e.g.* thermoluminescence, datation radiocarbone, datation du mobilier céramique). De plus, les méthodes employées en anthropologie médico-légale doivent être robustes, fiables et précises puisque les résultats de l'estimation de l'intervalle *post mortem* conditionnent la prescriptibilité pénale d'un crime. À ce jour, l'anthropologue médico-légal ne dispose pas de méthode universelle répondant à ces critères et, face à des restes squelettiques, son estimation du délai *post mortem* repose le plus souvent soit sur sa propre expérience et est donc subjective, soit sur l'utilisation de méthodes qui présentent de nombreuses limites quant à leur reproductibilité, leur fiabilité, leur coût et leur difficulté de mise en œuvre.

C'est dans ce contexte que notre sujet de thèse s'est développé, faisant suite à une demande de l'Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie Nationale (IRCGN), afin de tenter d'apporter une réponse à l'épineuse question de l'estimation de l'intervalle *post mortem* en contexte médico-légal en lui apportant une solution scientifique, objective, précise et fiable. À ce jour, les anthropologues de l'IRCGN utilisent essentiellement les méthodes de coloration au bleu de Nil et les méthodes de datation radiocarbone. Au cours de ce travail de thèse, nous avons utilisé une technique qui jusque là a été peu employée sur le tissu osseux en contextes archéologique et médico-légal : la spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Cette technique permet d'observer les noyaux des atomes constituant des échantillons dans des

domaines aussi divers que la physique, la mécanique, la géologie, la chimie, la biochimie, la biologie, l'agronomie, l'agriculture et la médecine. Elle permet d'analyser la matière inerte ou vivante dans ses états liquides, solides, de matières molles ou encore de gaz. La particularité de cette technique est d'abord son aspect quantitatif puisque de la quantité de matière placée dans le champ magnétique dépend l'intensité du signal. Sa deuxième particularité réside dans ce que nous observons, le spectre, qui est constitué de pics (résonances) dont la position et la forme dépendent de l'environnement chimique local (de l'ordre de l'angström Å) et global (de l'ordre du millimètre) du noyau des atomes analysés. L'os, de par sa composition (*i.e.* hydroxyapatite, collagène, lipides), peut être étudié par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire. Ses différents constituants variant avec le délai *post mortem*, une approche de cette problématique par RMN peut alors être envisagée. Contrairement à d'autres méthodes (*e.g.* coloration au bleu de Nil, datation radiocarbone), cette technique présente de nombreux avantages et notamment celui de ne nécessiter aucun traitement chimique des échantillons. Nous pouvons donc réaliser plusieurs analyses sur un même échantillon et réitérer une même analyse que ce soit pour valider nos résultats ou réaliser une contre-expertise judiciaire.

Les objectifs de notre travail sont donc (1) d'élaborer un protocole d'étude du tissu osseux par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire ; (2) d'identifier les différents constituants du tissu osseux ; (3) d'analyser les facteurs de variation de ces constituants (variabilité intra et inter-individuelle, influence des conditions de conservation et évolution en fonction de l'intervalle *post mortem*).

Notre travail s'organise en six parties se divisant elles-mêmes en chapitres. Tout d'abord, nous détaillerons les spécificités de notre matériel d'étude, le tissu osseux, de sa composition moléculaire à sa dégradation après le décès de l'individu, tout en abordant les méthodes d'estimation du délai *post mortem* existantes et leurs limites. Dans un deuxième temps, nous aborderons la question du statut juridique du corps humain, volet permettant d'appréhender la place de la recherche scientifique sur le corps humain en France. Dans une troisième partie, nous exposerons les bases phénoménologiques de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire. La quatrième partie est dédiée à la description du matériel étudié, qu'il soit ostéologique ou non, et à la présentation des méthodes de prélèvement, de préparation et d'analyses RMN des échantillons. Les résultats de cette étude seront développés dans la cinquième partie que ce soit au niveau de la validation du protocole d'étude RMN, de l'identification de dégradation ou d'altération du tissu osseux, de l'étude de la variabilité intra- et inter-individuelle des constituants du tissu osseux ou enfin de l'étude des paramètres corrélés à l'intervalle *post mortem* telle l'influence des conditions de conservation. Cette partie étant assez dense, nous avons choisi de discuter les résultats au fur et à mesure de leur obtention. Ils feront cependant l'objet d'une synthèse et d'une discussion générale dans la sixième partie. Nous concluons ensuite et nous proposerons des perspectives pour poursuivre ce travail.

PREMIERE PARTIE

De l'os à l'estimation de l'intervalle *post mortem*

L'estimation du délai *post mortem* est une question cruciale en sciences médico-légales. Son abord ne peut être envisagé qu'en tenant compte des spécificités du matériel analysé – l'os – et du comportement de celui-ci après le décès de l'individu. En effet, la première étape dans la compréhension de la détérioration du tissu osseux est la compréhension de son organisation. Dans un premier temps, nous allons détailler la composition et la structure du tissu osseux ; puis nous verrons comment il se dégrade après la mort au cours du temps ; et, enfin, nous ferons le point sur les méthodes d'estimation de l'intervalle *post mortem* existantes, leur principe, leur fiabilité, et leurs limites.

1. LE TISSU OSSEUX

Le squelette humain est constitué d'os qui sont reliés entre eux au niveau des articulations via les synchondroses. Ses différentes fonctions en font un tissu complexe et composite, solide mais léger, rigide mais dynamique, hautement hiérarchisé. Cette organisation existe de l'échelle macroscopique – l'os entier – jusqu'à l'échelle moléculaire – les molécules d'hydroxyapatite contenues dans la matrice extra-cellulaire minéralisée. Ces différentes composantes vont être à présent détaillées.

1.1. FONCTIONS ET ANATOMIE

1.1.1. Fonctions

La composition chimique et la structure cristalline de l'os jouent un rôle essentiel dans ses fonctions biologiques et structurelles. En effet, c'est un tissu composite associant une fraction organique renforcée par une fraction minérale (de Carmejane *et al.* 2005). Cette composition permet au tissu osseux d'assurer différentes fonctions pour l'organisme : des fonctions mécaniques et structurelles grâce à ses propriétés de souplesse, de légèreté et de rigidité, lui permettant une adaptation aux contraintes de la posture et de la locomotion tout en assurant le soutien et la protection des organes ; des fonctions hématopoïétiques car il contient la moelle osseuse assurant l'hématopoïèse (processus physiologique à l'origine de la production des cellules sanguines tels les globules rouges et les globules blancs) ; et des fonctions homéostasiques et métaboliques en agissant en tant que réservoir en sels minéraux et en calcium pour l'organisme (Thomas *et al.* 2011).

1.1.2. Anatomie

Le squelette humain adulte est constitué de 206 os (avec la présence éventuelle d'os surnuméraires) qui présentent une grande variabilité de forme et de taille.

1.1.2.1. Organisation macroscopique

Tous les os du squelette sont constitués de deux composantes structurelles : l'os cortical et l'os trabéculaire (Figure 1).



Figure 1 – Coupe d'un fémur gauche mettant en évidence l'os trabéculaire et l'os cortical

(Photo K. Salesse, UMR 5199 PACEA)

L'**os cortical** ou **compact** est la partie dense de l'os constituant la surface externe des os. L'**os trabéculaire** ou **spongieux**, est un os plus poreux et léger se trouvant à l'intérieur des os et ayant une structure rappelant celle d'un nid d'abeille (White et Folkens 2005). D'un point de vue morphologique, l'os d'un individu adulte est composé, en moyenne et en masse, d'environ 80 % d'os cortical et 20 % d'os trabéculaire.

1.1.2.2. Types d'os

Les os constituant le squelette peuvent être classés selon leur forme : on distingue ainsi les os longs, courts et plats. Malgré cette variabilité de forme externe, la composition des os au niveau macroscopique et microscopique reste constante (White et Folkens 2005).

Les **os longs** (par exemple les os des membres, la plupart des os des mains et des pieds) sont des os dont la longueur est très supérieure à la largeur et à l'épaisseur lui conférant une forme tubulaire. Ils sont constitués d'une **diaphyse** s'élargissant aux **extrémités** (Figure 2).

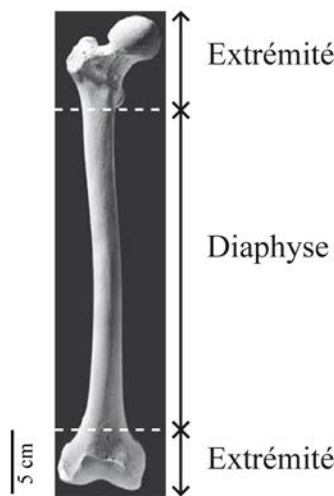


Figure 2 – Exemple d'un os long (fémur droit)

(D'après White et Folkens 2005)

Lorsqu'un os long est immature, la diaphyse et les extrémités (alors appelées épiphyses) sont séparées par les métaphyses qui correspondent aux zones où a lieu la croissance longitudinale de l'os (cartilage de conjugaison). Classiquement, les diaphyses des os longs sont composées d'os cortical en périphérie et elles renferment la moelle osseuse jaune ou grasseuse chez les sujets adultes. Les extrémités sont, quant à elles, constituées d'os cortical externe protégeant l'os trabéculaire sous-jacent, lequel renferme la moelle osseuse rouge hématopoïétique.

Les **os courts**, à l'inverse, n'ont aucune dimension qui est vraiment supérieure aux autres. Ils sont donc plus massifs et irréguliers, et présentent une forme arrondie voire cubique (par exemple les os du tarse, du carpe ou de la colonne vertébrale) (Figure 3). Les os courts sont une masse d'os trabéculaire entourée d'os cortical.

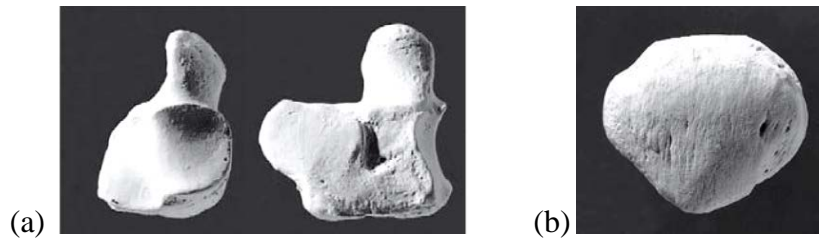


Figure 3 – Exemples d'os courts

(a) Hamatum droit ; (b) Patella droite
(D'après White et Folkens 2005)

Les **os plats**, quant à eux, présentent une grande largeur et une grande longueur mais sont peu épais leur conférant une forme aplatie (par exemple les os de la voûte crânienne, les scapula, les os coxaux) (Figure 4). Les os plats sont constitués de deux lames d'os cortical enfermant une lamelle d'os trabéculaire.

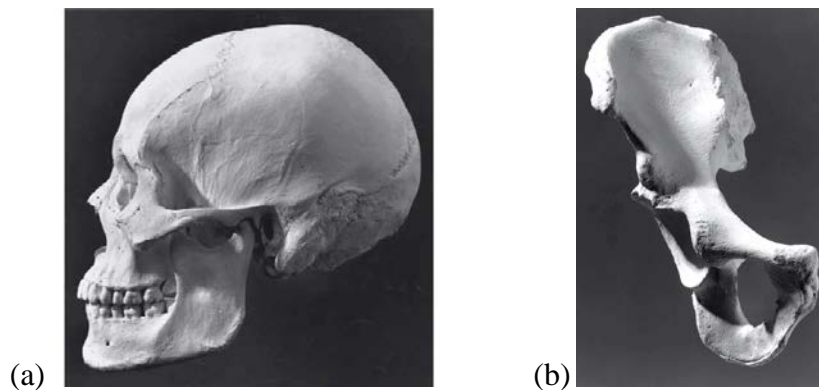


Figure 4 – Exemples d'os plats

(a) Bloc crânio-facial et mandibule en vue latérale gauche ; (b) Os coxal droit
(D'après White et Folkens 2005)

1.1.2.3. Organisation microscopique

Schématiquement, le tissu osseux est composé de fibres de collagène minéralisées. Nous verrons plus loin que sa composition n'est pas si simple mais, pour le moment cette approximation est suffisante pour aborder l'organisation microscopique du tissu osseux.

Que ce soit au sein de l'os cortical ou de l'os trabéculaire, le tissu osseux peut être fibrillaire ou lamellaire. Les fibres de **l'os fibrillaire** sont alignées de manière aléatoire, disposition leur

conférant peu de solidité. En revanche, les fibres de **l'os lamellaire** sont alignées parallèlement et sont, de ce fait, plus solides.

Le tissu osseux correspond à des fibres de collagène minéralisées (unité de base de l'os) ayant une épaisseur de 80-100 nm pour une longueur d'une dizaine de micromètres (Dorozhkin 2007). Les fibres de collagène forment une trame tridimensionnelle au sein de laquelle se situe la fraction minérale. La structure de l'os peut être comprise plus facilement en la différenciant en 7 niveaux d'organisation grâce à la forte hiérarchisation de sa structure (Figure 5) (Rho *et al.* 1998 ; Weiner et Wagner 1998) :

- Niveau 1 - Composition moléculaire : hydroxyapatite, fibres de collagène et eau essentiellement.
- Niveau 2 - Fibrilles de collagène minéralisées : dépôt d'hydroxyapatite au sein de la matrice collagénique.
- Niveau 3 - Organisation des fibrilles entre elles sous forme de fibres.
- Niveau 4 - Organisation des fibres entre elles (parallèle, radiale).
- Niveau 5 - Ostéons
- Niveau 6 - Os cortical et os trabéculaire
- Niveau 7 - Os entier

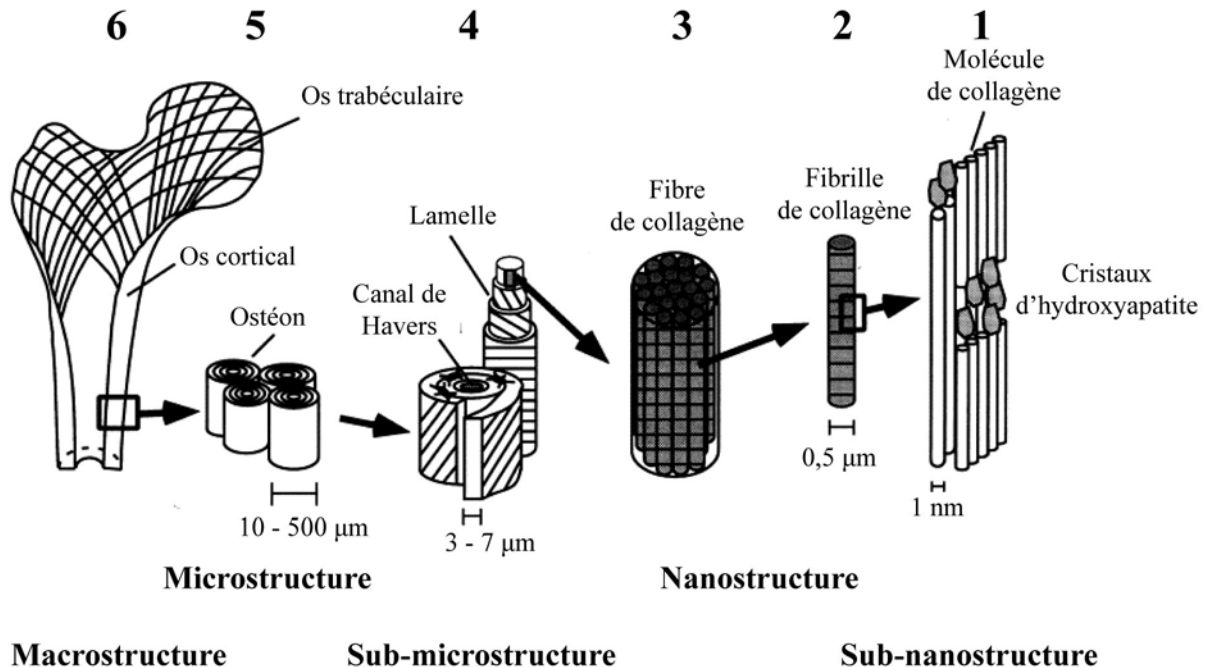


Figure 5 – Organisation hiérarchique de l'os

1) Composition moléculaire ; 2) Fibrilles de collagène minéralisées ; 3) Fibres de collagène ; 4) Organisation des fibres de collagène entre elles ; 5) Ostéon ; 6) Os cortical et os trabéculaire.

(Modifié d'après Rho *et al.* 1998)

Au niveau histologique, on retrouve l'os fibrillaire principalement au niveau de l'os trabéculaire et l'os lamellaire au niveau de l'os cortical. L'os cortical est si dense qu'il ne peut pas être nourri par les vaisseaux sanguins de surface. La nutrition (sang, lymphes et fibres nerveuses) se fait donc par l'intermédiaire des canaux des systèmes de Havers (Figure 6). Ces derniers sont une superposition de 4 à 8 lamelles osseuses (qui prennent l'aspect d'anneaux concentriques en coupe) : on parle d'ostéon qui est l'unité structurale de base de l'os compact. Au sein de chaque lamelle se trouvent des lacunes hébergeant des ostéocytes (cellules osseuses inactives). Deux autres types de cellules sont retrouvées dans le tissu osseux : les ostéoblastes (responsables de la synthèse du tissu ostéoïde) et les ostéoclastes (responsable de la résorption du tissu osseux) (Thomas *et al.* 2011).

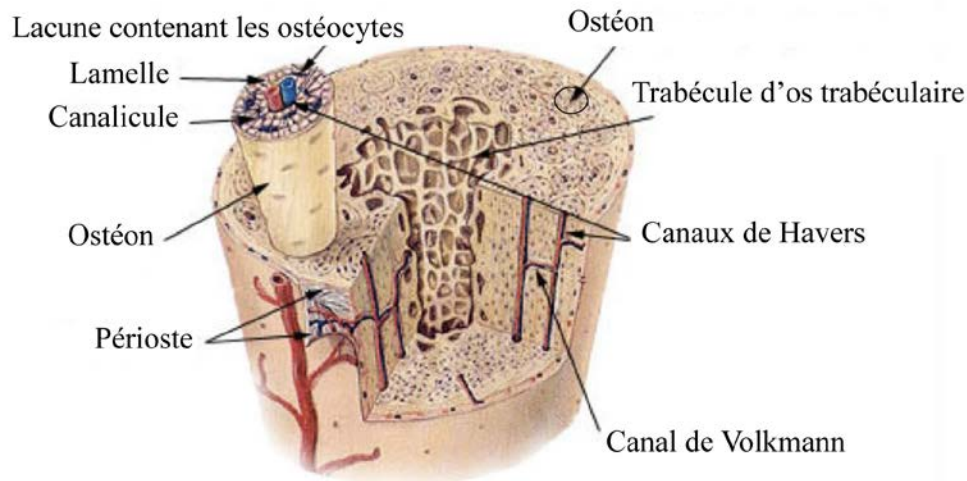


Figure 6 – Schéma d'un os long montrant l'os cortical et l'os trabéculaire

(Modifié d'après <http://training.seer.cancer.gov/anatomy/skeletal/tissue.html> en date du 23/10/2013)

L'os est un tissu dynamique faisant l'objet d'un remaniement continu : on parle de remodelage osseux. Il existe un équilibre entre la synthèse du tissu ostéoïde et la résorption du tissu osseux. Lorsque l'os est en croissance, la balance est positive en faveur de la synthèse : on parle de modelage osseux. La résorption autorise le remodelage de l'os afin de lui permettre de croître tout en conservant sa forme et en s'adaptant à sa fonction. En revanche, lorsque la balance est négative que ce soit avec l'âge ou à la suite d'un processus pathologique, l'organisme perd du tissu osseux, l'os cortical s'amincit et l'os trabéculaire se raréfie : ce phénomène pathologique correspond à l'ostéoporose (Chavassieux et Meunier 2003).

1.2. COMPOSITION

1.2.1. La matrice extra-cellulaire

La composition moléculaire et cellulaire des os cortical et trabéculaire est la même. Elle consiste en deux fractions importantes :

- la phase **organique** qui représente 25 % du poids sec pour 32 à 44 % du volume, renferme principalement du collagène (LeGeros 1981 ; LeGeros 1991 ; Reiche *et al.* 1999 ; Olszta *et al.* 2007),
- la composante **minérale** qui constitue entre 65 % du poids sec pour 33 à 43 % du volume (LeGeros 1981 ; Olszta *et al.* 2007), essentiellement représentée par de l'hydroxyapatite.
- Ces deux fractions sont intimement associées à de l'**eau** : environ 10 % du poids pour 15 à 25 % du volume. L'eau est soit présente dans la fraction organique soit présente au sein de la structure cristalline de la matrice minérale (LeGeros 1981 ; LeGeros 1991 ; Olszta *et al.* 2007).

1.2.1.1. Phase organique

La fraction organique se compose essentiellement de collagène, de protéines non collagéniques et de lipides.

1.2.1.1.1. Collagène

Le collagène est une grosse protéine structurale ubiquiste qui représente environ 25 % de la totalité des protéines chez les Mammifères. On a identifié à ce jour 28 types de collagènes différents caractérisés par leur structure propre et leur localisation (Bolboaca et Jantschi 2007). Cette molécule a la particularité d'être hautement répétitive et insoluble (Nielsen-Marsh *et al.* 2000a). Le collagène osseux correspond essentiellement à du collagène de type I qui représente plus de 90 % de la fraction protéique de la matière organique osseuse. Les acides aminés sont les unités de base du collagène.

1.2.1.1.1.1. Acides aminés

Les acides aminés sont des composés chimiques qui possèdent deux groupements chimiques fonctionnels : un groupe carboxyle COOH et un groupe amine NH₂. Il existe 21 acides aminés protéinogènes chez les êtres humains (Tableau 1) (Balzer *et al.* 1997), auxquels se rajoutent quelques acides aminés modifiés par hydroxylation tels que l'hydroxylysine ou l'hydroxyproline

(Garrett et Grisham 2000). Les formules chimiques brute et semi développée des principaux acides aminés contenus dans le collagène osseux sont présentées en Annexe 1.

On différencie et classe les acides aminés en fonction de leurs chaînes latérales qui ont différentes propriétés : on parle ainsi par exemple d'acide aminé apolaire ou aliphatique ou hydrophobe ; d'acide aminé polaire ou hydrophile ; de composé aromatique. Chaque acide aminé peut être identifié à l'aide d'un code à une lettre ou d'un code à trois lettres spécifiés par le comité de nomenclature commun IUAPC-IUBMB (Union internationale de chimie pure et appliquée - Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire).

Tableau 1 – Codage des acides aminés et quantité relative des principaux acides aminés dans le collagène osseux (d'après Ambrose et Norr 1993)

Nom	Code		Proportion de l'acide aminé dans le collagène de type I (%) ^a	Nombre d'atomes de carbone	Proportion d'atomes de carbone dans le collagène de type I (%) ^b
	une lettre	trois lettres			
Alanine	A	Ala	11,2	3	8,80
Arginine	R	Arg	5,0	6	7,85
Acide Aspartique	D	Asp	n.c.	4	n.c.
Asparagine	N	Asn	4,4	4	4,61
Cystéine	C	Cys	n.c.	3	n.c.
Glutamine	Q	Gln	n.c.	5	n.c.
Acide Glutamique	E	Glu	7,4	5	9,69
Glycine	G	Gly	33,4	2	17,49
Histidine ^c	H	His	0,5	6	0,79
Isoleucine	I	Ile	0,9	6	1,41
Leucine	L	Leu	2,3	6	3,61
Lysine	K	Lys	2,7	6	4,24
Méthionine	M	Met	0,5	5	0,65
Phénylalanine ^c	F	Phe	1,2	9	2,83
Proline (hydroxyproline)	P	Pro	13,0 (8,9)	5	17,02
Sélocystéine	U	Sec	n.c.	3	n.c.
Sérine	S	Ser	3,6	3	2,83
Thréonine	T	Thr	1,7	4	1,78
Tryptophane ^c	W	Trp	n.c.	11	n.c.
Tyrosine ^c	Y	Tyr	0,3	9	0,71
Valine	V	Val	2,5	5	3,27

n.c. : non communiqué ; ^a Pourcentage que représente l'acide aminé par rapport au nombre d'acides aminés total présent dans le collagène de type I ; ^b Nombre d'atomes de carbone attribué à l'acide aminé par rapport au nombre total d'atomes de carbone présent dans le collagène de type I ; ^c Acides aminés présentant un cycle aromatique ; les structures chimiques sont données en Annexe 1.

Les acides aminés sont les unités de base de la construction des protéines. En effet, les acides aminés polymérisent par liaisons peptidiques et forment ainsi de longues chaînes

macromoléculaires. Selon la longueur de cette chaîne, on parle de peptides (moins de 50 acides aminés) ou de polypeptides (plus de 50 acides aminés). Les protéines correspondent à un ou plusieurs polypeptides. Elles présentent un repliement caractéristique en hélice α ou en feuillet β (structures secondaires) pour former une structure tridimensionnelle et elles peuvent porter des modifications post-traductionnelles.

Les acides aminés du collagène de type I correspondent à la répétition d'une séquence de trois acides aminés (Gly-X-Y)_n qui peut être considérée comme la signature du collagène (Brodsky et Persikov 2005). Cette séquence où X et Y sont fréquemment la proline et l'hydroxyproline autorise la protéine à s'assembler sous forme de triple hélice, appelée aussi hélice collagène ou hélice de type II (H_{II}).

1.2.1.1.1.2. Molécule de collagène

Le collagène est une molécule peu soluble qui se compose de trois chaînes polypeptidiques (chaîne α) comprenant plus de 1000 acides aminés chacune (Brodsky et Persikov 2005). La formation de ces trois chaînes sous forme de triple hélice est permise grâce à la séquence de trois acides aminés (Gly-X-Y)_n (Olszta *et al.* 2007). La triple hélice est de forme linéaire (300 nm de long pour 1,5 nm de diamètre) grâce à des liaisons hydrogène : on parle alors de **tropocollagène**, qui est l'unité fondamentale du collagène.

À l'état natif, le collagène de type I, riche en glycine et en proline, a une composition en acides aminés typique. La glycine, qui se retrouve approximativement tous les 3 acides aminés dans la séquence, est le plus petit acide aminé avec un atome d'hydrogène en chaîne latérale. Sa taille et son abondance permettent la formation d'une super-hélice (hélice de type PP_{II} pour PolyProline de type II) toutes les trois molécules α -hélicoïdales. La proline, l'autre constituant, a une structure cyclique et stabilise l'hélice. Les autres acides aminés abondants dans le collagène de type I sont l'hydroxylysine et l'hydroxyproline. L'hydroxyproline stabilise les trois chaînes de la super-hélice avec des ponts hydrogène entre les chaînes α , alors que l'hydroxylysine est responsable de la formation de ponts covalents pendant la formation des liaisons transversales secondaires des monomères (Balzer *et al.* 1997).

Chaque molécule de collagène est alignée avec d'autres de façon à former une **fibrille de collagène**. Les fibrilles sont ensuite regroupées en faisceaux afin de former la **fibre de collagène** (Figure 7).

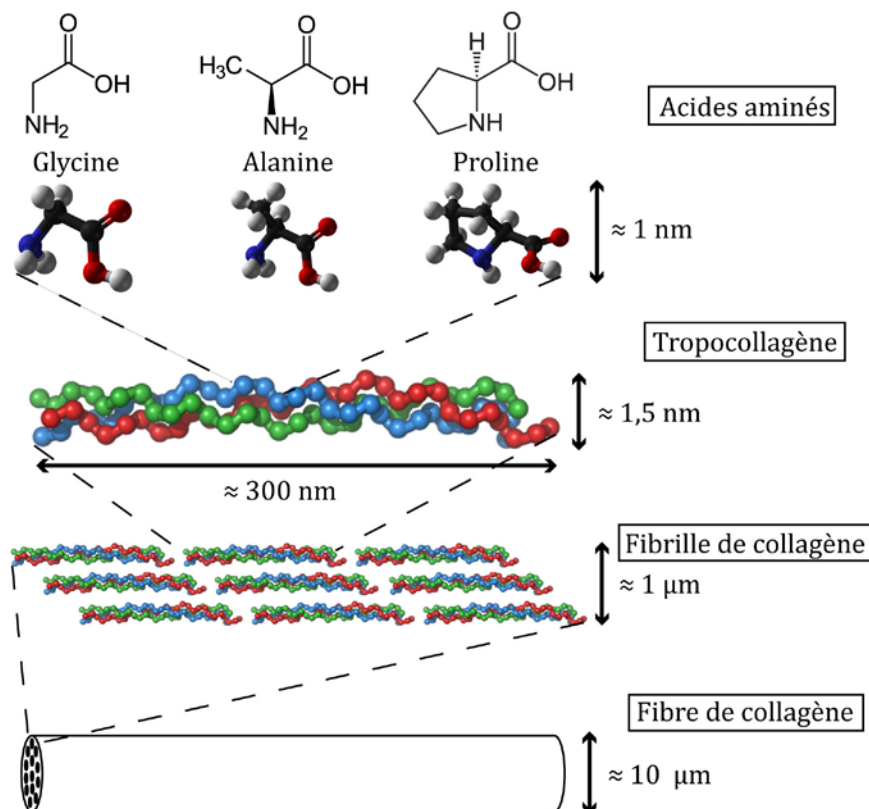


Figure 7 – Composition d'une fibre de collagène

Entre chaque molécule de collagène et entre chaque fibrille se retrouvent des espaces vides qui sont comblés par des dépôts de protéines non collagéniques ou de minéraux qui initient la minéralisation de la fibre de collagène (Lee et Einhorn 2001). Le réseau résultant est insoluble dans l'eau, a une structure robuste, stabilisée, repliée plusieurs fois, et, en étant encapsulée dans l'os minéral, est capable de persister pendant de longues périodes dans le sol (Balzer *et al.* 1997).

1.2.1.1.2. Protéines non collagéniques (PNC)

Elles sont nombreuses, plus de 200 (Jaeger *et al.* 2005), et ont une fonction très importante même si leur rôle n'est pas encore complètement résolu. Elles interviendraient dans la régulation de la formation de la phase minérale au sein des molécules de collagène (Roach 1994). Elles représentent environ 10 % de la masse de la matrice extra-cellulaire organique (Lee et Einhorn 2001 ; Olszta *et al.* 2007 ; Thomas *et al.* 2011). On distingue :

- Les protéines γ -carboxylées : ostéocalcine (15 à 25 % de toutes les PNC), protéines Gla matricielles (2 %) ;
- Les protéines d'adhésion : ostéonectine (15 à 25 %), ostéopontine, fibronectine, thrombospondines, sialoprotéines (10 %) ;

- Les protéoglycanes (4 %) : ce sont l'association par liaison covalente d'une protéine et de glyco-amino-glycanes ;
- Les facteurs de croissance (< 1 %) : TGF- β , IGF-II, BMP, FGF, PDGF ;
- Les protéines plasmatiques adsorbées : α_2 HS glycoprotéines (5 à 10 %), albumine (3 %), immunoglobulines (< 1 %).

1.2.1.1.3. Lipides

Les lipides sont des molécules hydrophobes, composées d'une tête polaire et d'une ou plusieurs chaînes apolaires, le plus souvent insolubles dans l'eau formant des phases organisées (*e.g.* liposomes). Ils sont majoritairement constitués d'atomes de carbone, hydrogène et oxygène. Ils englobent les acides gras, leurs dérivés (*e.g.* les triglycérides) et leurs métabolites. La fraction lipidique représente moins de 3 % de la masse de la phase organique du tissu osseux (Ambrose 1990) et les acides gras en représentent environ 1 % de la masse (Pinheiro 2006). Les lipides constituent les membranes cellulaires mais ont aussi un rôle important en tant que messenger cellulaire.

Sur les os frais, la concentration en lipides varie beaucoup d'un os à l'autre. Ces variations peuvent être attribuées à l'âge du sujet, son sexe, ses habitudes alimentaires (Castellano et Villanueva 1977). Sur un os récent, on retrouve essentiellement des triglycérides, puis, en proportions moins importantes des acides gras (glycérides), du cholestérol et des diglycérides (Castellano et Villanueva 1978a). Parmi les acides gras, on retrouve du plus abondant au moins abondant (en pourcentage du nombre d'acides gras total) : 49 % d'acide oléique (insaturé), 23,5 % d'acide palmitique (saturé), 7,7 % d'acide arachidonique (insaturé), 6,7 % d'acide palmitoléique (insaturé), 6,3 % d'acide stéarique (saturé) et 4 % d'acide myristique (saturé). Cela représente au total environ 63,4 % d'acides gras insaturés et 33,8 % d'acides gras saturés (Castellano et Villanueva 1978b).

1.2.1.2. Phase minérale

La fraction minérale du tissu osseux est principalement représentée par de l'hydroxyapatite, de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Figure 8) (De Jong 1926 ; Burton 2008). Le cristal d'hydroxyapatite a une forme aplatie de 20 à 80 nm de long pour 2 à 5 nm d'épaisseur (Lee et Einhorn 2001).

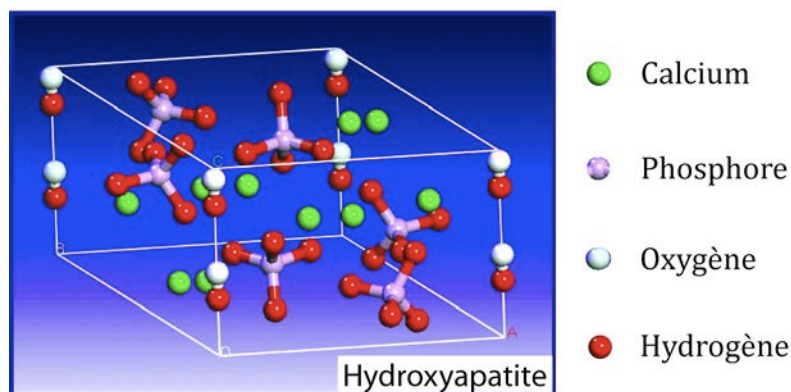


Figure 8 – Molécule d'hydroxyapatite stœchiométrique

(Modifié d'après <http://sciencegeist.net/wp-content/uploads/2010/11/hydroxyapatite.gif> en date du 10/12/2013)

Au sein du tissu osseux, l'hydroxyapatite ne se trouve pas sous forme stœchiométrique mais sous forme carbonatée $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2+x}$. On la nomme alors carbonato-hydroxyapatite ou bio-hydroxyapatite et elle est déposée dans la matrice organique lors de la minéralisation des fibres de collagène par les ostéoblastes (Kolodziejwski 2004). Malgré la présence de groupements hydroxyle OH dans l'hydroxyapatite, de nombreux auteurs mettent en évidence leur quasi absence dans l'os par les techniques de spectroscopie infra-rouge. Cette absence de groupements hydroxyle peut en partie s'expliquer par le fait que la bio-hydroxyapatite présente des substitutions des groupes phosphates par des groupes carbonates qui conduisent à une diminution simultanée des groupes hydroxyles (Rey *et al.* 1995). En effet, la bio-hydroxyapatite diffère chimiquement de l'hydroxyapatite pure ou stœchiométrique car elle contient des éléments traces se substituant au sein de la structure cristalline. Un de ces substituants majeurs est le carbonate (CO_3^{2-}) qui se retrouve à des niveaux élevés dans la fraction minérale de l'os, car il représente 5 à 8 % du poids de la partie minérale (Merry *et al.* 1998 ; Pasteris *et al.* 2004).

La fraction minérale restante, autre qu'hydroxyapatite, correspond à des sels minéraux ou éléments mineurs : essentiellement des ions calcium Ca^{2+} (6,4 % du poids), phosphate PO_4^{3-} , carbonate CO_3^{2-} , hydroxydes OH^- , de l'eau H_3O^+ , mais aussi des ions magnésium Mg^{2+} , sodium Na^+ , potassium K^+ et chlore Cl^- , fluor F^- ; avec quelques éléments traces : Sr^{2+} , Pb^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} entre autres (LeGeros 1981 ; Zwanziger 1989 ; LeGeros 1991 ; Bigi *et al.* 1997). Ces ions et éléments traces sont adsorbés à la surface du cristal et/ou substitués dans la structure cristalline en lieu et place des ions Ca^{2+} , PO_4^{3-} et OH^- . Ces substitutions altèrent la solubilité du cristal d'hydroxyapatite et jouent donc un rôle dans l'homéostasie de ces ions (Gokhale *et al.* 2001).

En 1941, Dickens (1941) a découvert que le tissu osseux contenait une part non négligeable du citrate, environ 70 à 90 % de tout le citrate contenu dans le corps humain. Le citrate est un

acide tricarboxylique et est le composant clé du cycle de Krebs dont la finalité est de produire des intermédiaires énergétiques qui serviront à la production d'adénosine triphosphate (ATP) fournissant l'énergie nécessaire aux réactions biochimiques de l'organisme (Schwarcz *et al.* 2010). Au niveau osseux, cela représente environ 1 % du poids de l'os (Knuuttila *et al.* 1985) et la teneur en citrate n'est pas dépendante de l'âge. Le citrate n'est pas seulement présent sous la forme de citrate de calcium, il existe aussi sous forme phosphorylée (Hartles 1964). Hartles (1964) a montré que, dans les os, le citrate était associé à une fraction nitrogenée contenant un peptide riche en arginine. Le citrate se fixe préférentiellement sur la surface du cristal d'hydroxyapatite (Gokhale *et al.* 2001). La teneur en citrate est variable selon le tissu considéré : elle est plus importante dans l'os cortical ($2 \% \pm 0,1 \%$ du poids) que dans l'os trabéculaire ($1,5 \% \pm 0,1 \%$) (Schwarcz *et al.* 2010).

1.2.1.3. Eau

L'eau contenue dans les os est présente sous deux formes : liée à la structure cristalline ou non (adsorbée). L'eau adsorbée est caractérisée par sa mobilité, sa réversibilité, son instabilité thermique en dessous de 200°C et elle n'a pas d'effet sur les propriétés de la structure cristalline. L'eau liée à la structure cristalline, elle, est non mobilisable, instable thermiquement à des températures supérieures (entre 200 et 400°C), et a une action sur la forme du cristal d'hydroxyapatite (LeGeros 1981).

1.2.2. Les cellules

Les cellules ne représentent qu'une faible partie des composants de l'os, environ 2 % de la masse sèche (Lee et Einhorn 2001). Cependant, l'activité cellulaire est intense et permet le renouvellement de la matrice osseuse ou « turn over », tous les 10-15 ans. On retrouve deux grands types de cellules : les ostéoblastes et ostéocytes, responsables de la synthèse et de la minéralisation de la matrice osseuse ; et les ostéoclastes, responsables de la résorption osseuse (Thomas *et al.* 2011).

Les **ostéoblastes** synthétisent le tissu ostéoïde qui correspond à la matrice organique de l'os (collagène et protéines) et participent aussi à sa minéralisation en favorisant le dépôt d'hydroxyapatite et autres minéraux. Les ostéoblastes se retrouvent préférentiellement sur les faces internes et externes des os. Au fur et à mesure du dépôt de la matrice ostéoïde, ils se retrouvent piégés entre les couches concentriques de tissu osseux. Ils prennent alors le nom d'**ostéocytes** dont la principale activité cellulaire correspond au maintien de la matrice extracellulaire. Ces deux types cellulaires sont d'origine mésenchymateuses (cellule souche mésenchymateuse).

Les **ostéoclastes** sont responsables de la résorption osseuse grâce à la sécrétion d'enzymes protéolytiques, les lacunes résorbées sont appelées des lacunes de Howship. Les ostéoclastes sont de grosses cellules multinucléées d'origine hématopoïétique (cellule souche hématopoïétique).

2. LA DEGRADATION DU CADAVRE ET DU TISSU OSSEUX APRES LA MORT

Le tissu osseux est un tissu dynamique en perpétuel remaniement du vivant de l'individu. Après le décès, il continue à être réactif avec son environnement en réponse à des sollicitations internes (autolyse) ou externes (conditions environnementales) qui affecteront les processus de décomposition et de diagenèse (vonEndt et Ortner 1984). La **décomposition** correspond au processus complexe qui permet la transformation du cadavre en squelette, en passant par la destruction des tissus mous (Figure 9) (Pinheiro 2006). Le cadavre peut suivre différentes voies de décomposition, avec éventuellement des phénomènes de conservation partielle telle que la momification¹ ou la saponification. Le plus souvent, comme dans tous phénomènes biologiques, l'exception est la règle c'est-à-dire que dans des mêmes conditions, deux processus de décomposition ne seront jamais strictement identiques (Pinheiro 2006).

¹ Nous entendons par momification, les processus naturels de dessiccation du cadavre permettant une préservation d'une partie des tissus mous. Nous ne tenons pas compte ici des actions anthropiques qui visent à reproduire artificiellement ce phénomène, ces actions définissent alors le sens archéologique du terme.

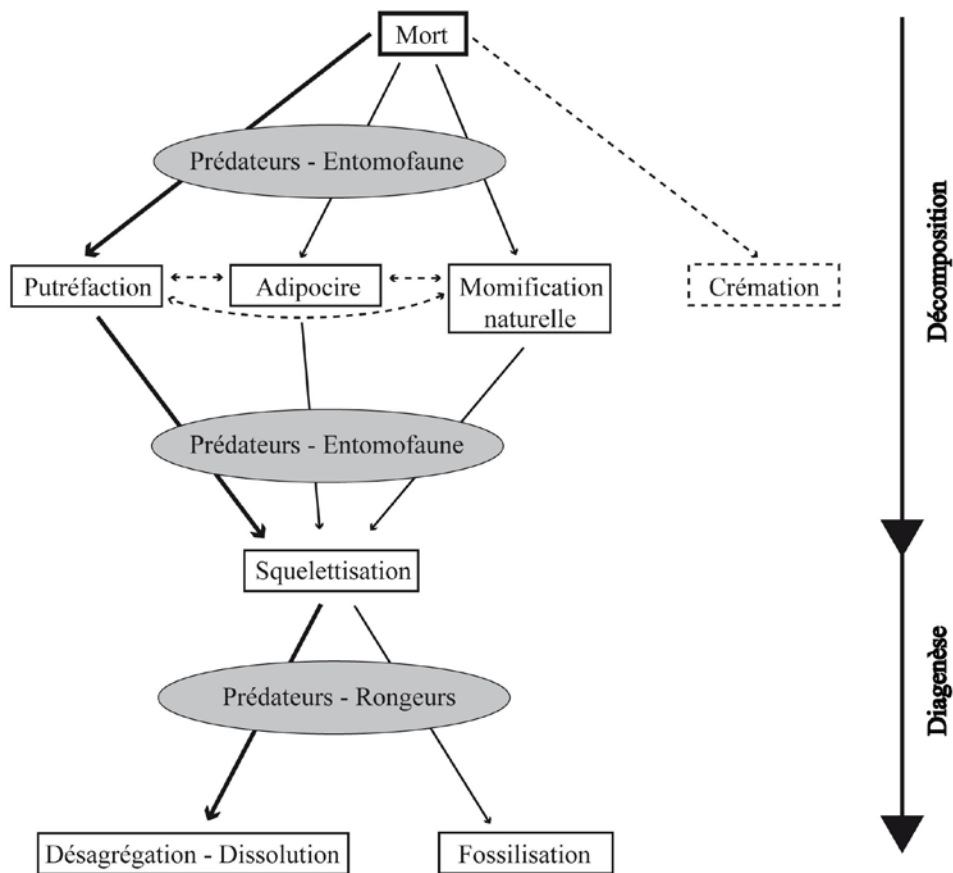


Figure 9 – Étapes de la décomposition d'un cadavre

(Adapté de Knight 1996 ; Pinheiro 2006)

2.1. DEFINITIONS

La **mort** est couramment définie comme un événement, alors qu'en fait, il s'agit d'un processus (cf. partie 2, page 90). Toutes les cellules d'un organisme ne meurent pas de manière simultanée. La défaillance du système cardiaque conduit à la privation en oxygène des tissus entraînant ainsi une série d'événements : désorganisation chimique, défaillances du métabolisme cellulaire et des processus de réparation cellulaire, et *in fine*, des effets tissulaires importants communément associés aux stades observables de la décomposition (Gill-King 1997).

La **décomposition** peut se diviser en deux phénomènes majeurs : d'une part, l'**autolyse** qui est la destruction des cellules et des organes par un processus chimique aseptique ; et d'autre part, la **putréfaction** qui est la lyse des tissus par les bactéries et la fermentation (Di Maio et Di Maio 2001). La squelettisation² et la fossilisation des os sont l'aboutissement de ces processus.

² Néologisme désignant le passage du cadavre au squelette

La science qui étudie ces phénomènes de décomposition est la **taphonomie**. Initialement, ce terme était employé pour l'étude de la transition des restes animaux de la biosphère (du vivant de l'organisme) à la lithosphère (fossilisation) mais aussi pour l'étude des lois sur l'enfouissement (Efremov 1940). Les premiers buts de cette discipline ont été (1) la reconstruction des paléoenvironnements ; (2) l'identification des facteurs causant une destruction ou une attrition différentielle des os ; (3) la compréhension du transport sélectif des restes osseux ; et (4) la discrimination entre l'origine humaine ou non humaine des agents responsables de la modification des os. Ce terme a ensuite été repris et interprété en fonction des différentes disciplines.

Appliquée en contexte archéologique, la taphonomie du cadavre permet, par sa compréhension, de reconnaître et d'interpréter les gestes funéraires qui ont été réalisés. Cette discipline, la **thanato-archéologie** (ou archéologie « de terrain »), repose sur l'étude de la position des os au sein de la sépulture. En tenant compte de la labilité des articulations et de l'ordre de dislocation articulaire au cours de la décomposition du cadavre, on peut restituer la position originelle du corps au moment du dépôt, déterminer si la décomposition a eu lieu en espace colmaté (pleine terre) ou en espace vide (air libre ou cercueil), ou encore mettre en évidence d'éventuels déplacements intentionnels ou non d'os, ou de possibles ré-interventions sur le squelette (Duday *et al.* 1990 ; Duday 2009).

En anthropologie médico-légale, seuls les trois derniers objectifs de la taphonomie telle que définie par Efremov (Efremov 1940) sont suivis auxquels se rajoutent ceux spécifiques à la décomposition des tissus mous. Selon Haglund et Sorg (1997b), la **taphonomie médico-légale** peut donc se définir comme l'étude des processus *post mortem* qui affectent (1) la préservation, l'observation, la découverte des organismes décédés ; (2) la reconstruction de leur biologie et écologie ; ou (3) la reconstruction des circonstances de leur mort.

2.2. L'AUTOLYSE

Les premiers signes physiques de l'autolyse apparaissent dans les deux heures suivant la mort. L'arrêt de la circulation sanguine provoque un manque d'oxygénation des tissus ce qui conduit à une pâleur de ces tissus, celle-ci est suivie par un relâchement des muscles squelettiques et des sphincters (Clark *et al.* 1997). L'élément déclencheur de l'autolyse serait la diminution du pH intracellulaire à la suite de la diminution de la teneur tissulaire en oxygène. Au cours de ce processus, les enzymes hydrolytiques présentes dans les lysosomes cellulaires sont relarguées dans le cytoplasme. Il y a alors rupture des membranes cellulaires et libération de molécules qui seront utilisées comme nutriments par les microorganismes (Pinheiro 2006). Dans les premières phases on observe aussi des altérations oculaires internes (coagulation intravasculaire des vaisseaux sanguins rétinien) et externes (opacité de la cornée ou « tache

noire sclérotique »). Puis, avec l'accumulation de dioxyde de carbone et autres produits chimiques résultant de la lyse tissulaire, le sang devient de plus en plus acide et entraîne le développement de la rigidité cadavérique (Clark *et al.* 1997).

Dès 48 heures après le décès, peuvent apparaître les premiers signes de la décomposition qui marquent aussi une autolyse avancée, il s'agit d'un décollement de la peau, d'une perte des cheveux et des ongles. Au niveau interne, l'hémolyse intravasculaire conduit au « marbling », il s'agit d'une colonisation du système veineux par les bactéries intestinales qui hémolysent le sang (Pinheiro 2006).

2.3. LA PUTREFACTION

La putréfaction est un phénomène dynamique, non homogène à l'échelle de l'individu ni identique entre deux individus décédés dans les mêmes conditions (Gill-King 1997). Même si les grandes étapes de la décomposition sont les mêmes, de grandes variations peuvent exister que ce soit en termes de vitesse ou de séquence de décomposition (Pinheiro 2006).

Généralement, la classification de la décomposition repose sur les séquences observées pour un corps laissé à l'air libre (Galloway 1997). En fonction du milieu de conservation (corps enterré, immergé), ces stades de décomposition seront modifiés voire inexistants. Nous reviendrons plus tard sur ces différentes conditions de décomposition.

2.3.1. Facteurs influençant l'autolyse et la putréfaction

Les phénomènes d'autolyse et de putréfaction vont être dépendants de nombreux facteurs qui vont les accélérer ou les ralentir. Ainsi tous les facteurs qui vont faciliter les processus chimiques de lyse des tissus (température élevée, humidité) et d'accès au corps pour les insectes et les charognards (milieu ouvert, corps à l'air libre) accéléreront la décomposition. Inversement, des températures trop basses ou très élevées associées à un climat sec, ou un corps enfoui, vont inhiber les phénomènes de lyse bactérienne et d'accès aux insectes ce qui ralentit la décomposition (Haglund et Sorg 1997b ; Beauthier 2011).

Si l'on ne tient pas compte des animaux nécrophages – dont l'action sur les os est difficilement prévisible – les principaux facteurs influençant l'autolyse et la putréfaction sont la température, l'humidité, le pH du sol, la pression partielle en oxygène, l'accès à la faune et à la flore, le poids et la taille de l'individu, la présence de vêtements, le traitement du corps (congélation, embaumement), la profondeur d'enfouissement, sa localisation (immersion). Tous

ces facteurs sont plus ou moins dépendants les uns des autres (Gill-King 1997 ; Sledzik 1998 ; Forbes *et al.* 2005a, b, c ; Pinheiro 2006 ; Adlam et Simmons 2007).

Nous allons rapidement détailler les principaux facteurs influençant la décomposition.

2.3.1.1. La température

La température est la **variable la plus importante** influençant la durée de certains stades et la vitesse du processus de décomposition dans son ensemble. Dans les phases précoces de l'autolyse, la température corporelle normale se situant autour de 37 °C, toute augmentation ou diminution accélère ou ralentit le métabolisme cellulaire en affectant les enzymes catalytiques. Ensuite, lorsque la température du corps ne dépend plus que de l'environnement, elle devient dépendante, entre autres, de la latitude, de l'altitude, de la profondeur d'ensevelissement, du degré d'hygrométrie du sol, des mouvements d'air (Gill-King 1997).

La profondeur d'enfouissement a une grande importance sur la régulation de la température. De plus grandes fluctuations de températures sont observées lorsque les enfouissements sont peu profonds (inférieurs à 0,3 m), ces fluctuations suivent alors des cycles quotidiens en plus de variations saisonnières. En effet, le sol procure une barrière contre les radiations solaires responsables du réchauffement. Les différences de températures sont donc moins importantes lorsque la profondeur d'enfouissement augmente (Rodriguez et Bass 1985). Les températures optimales de décomposition se situent donc dans l'intervalle compris entre 10 et 40 °C, températures en dessous de laquelle la putréfaction est inhibée et en dessus de laquelle la survie bactérienne diminue et les tissus se dessèchent rapidement (Forbes *et al.* 2005b).

2.3.1.2. L'eau

L'eau est un composé chimique essentiel à la vie de tous les êtres vivants. Elle a un rôle stabilisateur sur la température des organismes, un rôle tampon au sein des tissus pour atténuer les environnements basiques ou acides (rôle osmotique). Elle est aussi une source d'atomes d'hydrogène indispensables aux réactions biochimiques cellulaires. De par ces propriétés, elle a donc des effets physiques et chimiques sur la décomposition (Gill-King 1997 ; Turner-Walker 2008).

Dans les premières phases de la décomposition, c'est l'hydratation du corps lui-même qui est importante. Les tissus qui sont beaucoup hydratés se décomposent plus vite (pathologies cardiaques congestives par exemple) que les tissus des personnes présentant une forte déshydratation (diarrhées et vomissement) (Pinheiro 2006).

Ensuite ce sont les variations dans le taux d'humidité qui favorisent le développement de mycètes, de bactéries et de plantes, et accélèrent ainsi les interactions de ceux-ci avec les tissus en décomposition (Gill-King 1997). De même, une humidité plus importante favorise la saponification des graisses car l'eau réduit le taux d'oxydation des acides gras, ce qui les rend disponible pour une liaison chimique avec des sels lorsque le pH est bas. Cependant, pour les corps immergés, en fonction des propriétés chimiques de l'eau (*e.g.* eau douce, salée, vive, calme, son pH), la décomposition peut aussi bien être accélérée que ralentie.

Il est communément admis que plus la température et le taux d'humidité sont importants et plus les vitesses de décomposition et de squelettisation sont rapides (Pinheiro 2006).

2.3.1.3. Le pH

Avec l'arrêt de la circulation sanguine, le système de régulation du pH ne remplissant plus son rôle tampon, les pH du sang et des tissus diminuent rapidement. Ces changements dans les pH intracellulaire, extracellulaire, et environnemental interviennent dans le processus de décomposition. Au niveau intracellulaire, les variations de pH altèrent les activités enzymatiques (leur demi-vie après la mort est de quelques heures) qui finissent par cesser au fur et à mesure de la dénaturation des protéines et des lipides. Cela entraîne une libération d'hydrogène et d'acides organiques. Parallèlement, il y a une diminution de l'oxygène en présence qui est utilisé pour les réactions de fermentation des hydrates de carbone (glucides) en acides (Gill-King 1997).

Au niveau du pH du sol, les bactéries anaérobies qui y sont présentes favorisent une diminution du pH environnant ce qui contribue au développement des mycètes. Ces mycètes agissent ensuite sur le cadavre mais aussi sur le développement des plantes avoisinantes (Gill-King 1997). Cette acidification du sol se produit dans les premières semaines suivant le décès (Rodriguez et Bass 1985 ; Haslam et Tibbett 2009) puis, dans les mois et les années qui suivent, on constate une alcalinisation du milieu (Gill-King 1997).

Le pH du sol est un paramètre important car les environnements hautement acides ou alcalins inhibent la croissance bactérienne et donc la décomposition (Forbes *et al.* 2005b). Il existe ainsi de nombreux exemples de conservation exceptionnelle dans les tourbières – qui sont un environnement acide et anaérobie propice – tels l'homme de Tollund au Danemark ou l'homme de Lindow en Grande-Bretagne (Connolly 1985 ; Turner-Walker et Peacock 2008).

2.3.1.4. La pression partielle en oxygène

La décomposition nécessite un milieu riche en oxygène favorable aux réactions d'oxydo-réduction et favorable à la survie et à la prolifération des bactéries aérobies et des mycètes (Forbes *et al.* 2005b). En cas de privation d'oxygène (corps enterrés profondément, immergés, situés à haute altitude (> 3000 m), ou laissés dans des endroits hermétiques (appartement)), la décomposition est plus lente (Gill-King 1997).

2.3.1.5. Paramètres propres aux individus

En plus des paramètres environnementaux que nous venons de voir qui influencent la vitesse de décomposition, il faut ajouter les paramètres individuels. Ces paramètres peuvent concerner l'état général de l'individu (pathologies) ou concerner les traitements dont la personne a fait l'objet. Ainsi, on retrouve une putréfaction plus rapide chez les enfants que chez les adultes, et plus rapide chez les individus obèses que minces. Les individus souffrant de septicémie ou de maladies infectieuses possèdent une flore bactérienne plus importante augmentant la vitesse de décomposition. Les lésions traumatiques par objets contondants, tranchants ou armes à feu affectent aussi la vitesse de décomposition en favorisant ou en créant une voie d'accès à l'air et aux insectes (Pinheiro 2006). En revanche, les personnes dont le corps a été embaumé présentent des vitesses de décomposition plus lentes (Mann *et al.* 1990) mais elle est variable en fonction du produit de conservation employé et du mode de traitement du corps (injection du produit *vs.* immersion dans le produit). Lors de l'injection des produits de conservation, on observe une meilleure conservation des organes internes et une décomposition plus rapide des membres (Sledzik 1998).

2.3.2. Ordre de décomposition tissulaire

Les tissus ne se décomposent pas tous de façon synchrone. Selon leur activité métabolique (taux de synthèse en ATP, de biosynthèse, et de transport membranaire), ils se décomposeront plus ou moins vite (Gill-King 1997). En général, l'ordre est le suivant :

- 1) *Intestin, estomac, organes accessoires de la digestion (pancréas et foie), muscle cardiaque, sang et éléments de la circulation.* C'est principalement, pour les organes de la digestion, dû à la quantité importante d'enzymes hydrolytiques qu'ils contiennent associée à la présence de bactéries de la flore gastro-intestinale. À leur proximité, les organes avoisinants présentent aussi une décomposition accélérée.
- 2) *Poumons et voies aériennes.* Ils contiennent une forte teneur en macrophages lesquels libèrent des enzymes hydrolytiques sous l'effet de la diminution du pH. De plus, ces tissus ne

sont plus protégés du milieu extérieur par la barrière broncho-ciliée et les bactéries déjà présentes dans le tractus respiratoire peuvent proliférer sans contrainte.

- 3) *Reins et vessie.*
- 4) *Cerveau et tissus nerveux.*
- 5) *Muscles squelettiques.*
- 6) *Tissus conjonctifs et téguments.* Ces tissus contiennent plus de protéines collagéniques. Ils sont ainsi plus difficiles à hydrolyser et donc ce sont les derniers à se décomposer. C'est le cas des tendons et des ligaments qui peuvent perdurer plusieurs mois voire années selon les conditions de conservation (Pinheiro 2006).

2.4. LES CONDITIONS DE DECOMPOSITION

2.4.1. Corps exposés à l'air libre

Les différents stades de décomposition du cadavre ont souvent été définis pour les corps laissés à l'air libre. Ainsi Galloway et collaborateurs (1989) classifient les restes humains en 5 grandes catégories : (1) frais, (2) début de décomposition, (3) décomposition avancée, (4) squelettisé et (5) altération des restes squelettiques. Chaque catégorie est ensuite subdivisée en sous-catégories (n'ayant pas un lien chronologique entre elles) permettant de représenter toutes les conditions de conservation des restes humains (Tableau 2). Cette classification a été établie à partir de l'observation des phénomènes de décomposition en milieu aride mais elle a été reprise par de nombreux auteurs dans des contextes différents (Megyesi *et al.* 2005 ; Weitzel 2005 ; Janjua et Rogers 2008 ; Fitzgerald et Oxenham 2009 ; Ayers 2010).

Tableau 2 – Catégories, stades de décomposition et estimation de l'intervalle post mortem pour les milieux arides (d'après Galloway et al. 1989)

Catégories et stades de décomposition		Intervalle <i>post mortem</i>
A.	Frais	
1.	Frais, pas de décoloration ni d'activité d'insecte	entre 1 et 7 jours
2.	Frais, dessèchement	
B.	Décomposition précoce	
1.	Apparence blanche à rose avec décollement de la peau; perte des cheveux et des poils	> 5 jours
2.	Décoloration grise à verte; persistance de tissus mous frais	entre 2 et 7 jours
3.	Décoloration brune, particulièrement sur les doigts, le nez, les oreilles; persistance de tissus mous frais	
4.	Gonflement avec décoloration verte	entre 8 jours et 1 mois
5.	Rupture de la paroi abdominale sous l'effet de la pression des gaz abdominaux; décoloration plus sombre	
6.	Décoloration brune à noire des membres; peau ayant une apparence tannée	
C.	Décomposition avancée	
1.	Décomposition entraînant un relâchement des tissus, un effondrement de la cavité abdominale, souvent accompagnés d'une activité importante des insectes	> 4-10 jours
2.	Décomposition humide avec exposition osseuse	entre 10 jours et 1 mois
3.	Momification; avec maintien de l'intégrité de certaines structures internes	
4.	Momification des tissus externes seuls; perte des organes internes par autolyse et activité des insectes	entre 2 et 9 mois
5.	Momification avec exposition osseuse inférieure à la moitié du squelette	
6.	Développement d'adipocire ^a	
D.	Squelettisation	entre 2 et 9 mois
1.	Os avec substances grasses et tissus décomposés	> 6 mois
2.	Os avec tissus desséchés ou momifiés recouvrant moins de la moitié du squelette	
3.	Os majoritairement secs mais maintenant un peu de substances grasses	
4.	Os secs	
E.	Décomposition extrême	
1.	Squelettisation avec décoloration, blanchiment	> 6 mois
2.	Squelettisation avec exfoliation	> 12-18 mois
3.	Squelettisation avec perte de substance métaphysaire, exposition de tissu osseux spongieux	> 5 ans

^a On définit par adipocire le « savon ammoniacal résultat de l'altération des lipides au cours de la décomposition cadavérique » (d'après <http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais-monolingue> en date du 10/09/2013)

Ces vitesses de décomposition sont modifiées en fonction des différentes conditions de conservation des individus mais aussi en fonction de leur habillement. Concernant la présence de vêtements, plusieurs auteurs constatent qu'ils ralentissent la décomposition (Galloway *et al.* 1989 ; Di Maio et Di Maio 2001). Il faut néanmoins tenir compte de la nature des fibres vestimentaires, qu'elles soient naturelles ou synthétiques.

2.4.2. Corps enterrés

La décomposition des corps enfouis dans le sol se fait selon deux mécanismes principaux : d'une part, la dégradation bactérienne des tissus ; et d'autre part, l'hydrolyse chimique du collagène osseux. Dans tous les sols aérés, ces deux mécanismes sont concomitants (van Klinken

1999) mais se font à différentes vitesses en fonction de la profondeur d'enfouissement et de la température locale. Les corps enterrés se décomposent plus lentement que les corps laissés à l'air libre (Vass *et al.* 1992), on estime que la décomposition est huit fois plus lente qu'en plein air (Pinheiro 2006).

Le retard de décomposition en pleine terre peut être attribué à deux facteurs principaux. D'une part, la profondeur d'enfouissement limite l'accès au corps pour les insectes, les charognards et les rongeurs (Rodriguez 1997). De ce fait, le ralentissement dans la décomposition est directement lié à la profondeur d'enfouissement (et ce dès 30 cm de profondeur) et à la densité du sol (Rodriguez et Bass 1985). Si le corps est peu profondément enterré, il sera accessible aux plantes par l'intermédiaire de leurs racines. Les racines se nourrissent de toutes les matières organiques produites par la dégradation de l'organisme. La végétation recouvrant un corps sera donc différente, en général plus abondante et présentant une flore variée. De même, en faible profondeur, il existe des bactéries et des insectes qui sont plus actifs et qui contribuent ainsi à la dégradation plus rapide du corps. D'autre part, le second facteur est la présence du sol, en effet, le sol fournit une barrière contre les radiations solaires et diminue les effets des variations de la température, d'autant plus que l'ensevelissement est profond (Figure 10).



Figure 10 – Sépulture d'un soldat de la Première Guerre mondiale inhumé directement en pleine terre

(Photo F. Adam, Inrap Grand Est nord, Metz, France)

La nature du sol affecte également la décomposition. Un sol retenant l'humidité telle l'argile, procure un environnement favorable à la formation d'adipocire, alors que les sols secs ou bien drainés, y sont peu favorables (Rodriguez 1997).

Les corps enterrés dans des cercueils sont le plus souvent habillés et ils réagissent différemment aux phénomènes de décomposition. Ils présentent une décomposition plus lente que dans des sépultures de masse ou des inhumations clandestines (Ross et Cunningham 2011). Pour Breitmeier et collaborateurs (2005), la squelettisation d'un corps enterré en cercueil peut être ralentie par l'accumulation de lipides sur le corps, et de ce fait, même après 10-20 ans, la squelettisation n'est toujours pas complète. Le sexe, l'âge au décès ainsi que les changements corporels avant la mort (plaie et trauma) n'influencent pas le degré de dégradation du corps dans un cercueil.

2.4.3. Corps submergés et immergés

La décomposition en milieu aquatique se fait plus lentement qu'à l'air libre, elle demande généralement deux fois plus de temps (Rodriguez 1997). Les causes de ce ralentissement sont les mêmes que pour les corps enterrés c'est-à-dire à cause d'un accès plus difficile pour les insectes et les prédateurs, et d'une température plus basse (Pinheiro 2006). De plus, de façon générale, la décomposition en eau de mer est plus lente que celle en eau douce (Rodriguez 1997).

Classiquement, à la suite du décès, le corps coule, puis sous l'effet des gaz de putréfaction, remonte. Les zones corporelles alors exposées seront alors accessibles aux insectes. Le temps nécessaire à la remontée du corps est dépendant de la profondeur et de la température de l'eau, cela peut aller de quelques jours à plusieurs mois. La vitesse de décomposition est aussi fonction de la teneur en bactéries de l'eau (Rodriguez 1997).

Bien qu'étant un milieu protégeant des insectes et des prédateurs les plus courants, le milieu aquatique est favorable à d'autres prédateurs tels les oiseaux et la faune aquatique, qui en exposant le tissu adipeux à l'eau favorise l'apparition de l'adipocire (Pinheiro 2006) laquelle se forme préférentiellement dans les milieux anaérobies (Forbes *et al.* 2005b).

2.4.4. Cas particulier des phénomènes de momification et d'adipocire

En contexte médico-légal, la formation d'**adipocire** est un artéfact de la décomposition qui atteste du passage d'un certain temps depuis la mort, elle donne aussi des informations sur l'environnement de dépôt du corps (Sledzik et Micozzi 1997). Sa formation ralentit voire inhibe la décomposition (Forbes *et al.* 2005a).

Le phénomène de formation d'adipocire correspond à la saponification des graisses de l'organisme. Ce processus est variable et irrégulier, et est caractérisé par l'hydrolyse et l'hydrogénation du tissu adipeux (Forbes *et al.* 2005a ; Pinheiro 2006). Au moment du décès, la

teneur de l'organisme en acides gras est d'environ 1 %. Avec le processus de saponification, cette teneur peut atteindre 70 % en quelques mois (Pinheiro 2006).

Le tissu adipeux d'un organisme comprend essentiellement des triglycérides qui subissent une hydrolyse durant la phase de décomposition libérant ainsi des acides gras et des molécules de glycérol (Pinheiro 2006). Le processus entraîne progressivement une disparition complète de tous les triglycérides et une augmentation de la quantité d'acides gras insaturés. Ces acides gras insaturés sont hydrogénés en acides gras saturés. C'est l'hydrogénation de ces acides gras insaturés en acides gras saturés qui, sous certaines conditions, forment l'adipocire (Forbes *et al.* 2005b). Lorsqu'il ne reste que des acides gras saturés le processus est considéré comme stable (Pinheiro 2006).

Les conditions optimales pour la formation d'adipocire sont humides, chaudes dans un milieu anaérobie. Le corps en lui-même contient suffisamment d'eau pour induire la formation d'adipocire même si l'environnement du sol est sec (Forbes *et al.* 2005a). La présence d'adipocire peut se retrouver dès la première année de délai *post mortem*, elle peut persister au sein de la diaphyse (saponification de la moelle osseuse des os longs) pendant des décennies selon les conditions environnementales. Elle peut aussi coexister avec des phénomènes de momification, avec le plus souvent une saponification du tronc et une momification des extrémités et de la tête (Rodriguez et Bass 1985).

La **momification** (cf. note de bas de page 1 page 46) des tissus est une autre voie de conservation des tissus. Elle correspond à la déshydratation et la dessiccation progressives des tissus. Elle nécessite la présence d'un milieu sec, qu'il soit chaud ou inversement glaciaire, et ventilé. Le tissu cutané (épiderme) se tanne progressivement protégeant ainsi les tissus sous-jacents (Makristathis *et al.* 2002). Ce phénomène peut être partiel ou complet, et ainsi le corps peut associer des zones putréfiées, momifiées voire des zones présentant de l'adipocire (Pinheiro 2006).

2.5. LA SQUELETTISATION

La **squelettisation** correspond au processus par lequel sont éliminés les tissus mous encore présents sur les os lorsque la décomposition est très avancée. Elle peut être complète ou partielle si des restes de tissus mous persistent (comme par exemple les ligaments ou les tendons). À la suite de la perte de ces derniers tissus mous, on observe une désarticulation qui consiste en la perte de cohérence entre les articulations. Elle ne se fait pas de manière simultanée pour toutes les articulations.

Dans les contextes géographiques et climatiques d'Europe tempérée, en dehors de tout contexte géologique particulier (*i.e.* sol argileux, sableux), la squelettisation est l'état de

conservation du corps le plus fréquemment observé (vs. adipocire et momification), et si les conditions sont propices, elle peut être complète (Pinheiro 2006).

2.6. LA DIAGENESE

2.6.1. Définition

La **diagenèse** correspond à l'ensemble des altérations chimiques subies par le tissu osseux après décomposition des tissus mous et lorsque le corps est soumis aux effets de son environnement, qu'il soit enfoui ou non. Elle correspond plus particulièrement aux phénomènes de préservation et de destruction des fractions organiques (*e.g.* collagène, ADN, lipides) et minérales (hydroxyapatite) de l'os mais aussi aux processus associés à ces phénomènes (par exemple une attaque microbienne, la dissolution et la recristallisation) (Fernandez-Jalvo *et al.* 2010). La diagenèse est donc un processus naturel qui altère les proportions des composantes organiques et minérales du tissu osseux exposé aux conditions environnementales. Il s'agit d'un échange entre les constituants naturels de l'os, d'un dépôt dans les vides et défauts du tissu osseux, et de l'adsorption d'éléments à la surface de l'os. Cela peut aussi entraîner une altération de la composition du sol sur lequel les os reposent (Vass *et al.* 1992).

La recherche sur les phénomènes de la diagenèse s'est beaucoup développée au cours des dernières décennies. Elle porte essentiellement sur l'étude des modifications des structures externe et interne de l'os. Dans les années 1980, la recherche était menée sur des études de cas ce qui représentait un nombre limité d'exemples. Les études plus larges portant sur des restes humains étaient minoritaires (Galloway *et al.* 1989) et rétrospectives, les études prospectives étant exceptionnelles (Rodriguez et Bass 1985). Ainsi la nature anecdotique des données recueillies fournissait une base limitée pour développer des théories ou pour avoir une compréhension globale des variations observées (Haglund et Sorg 1997a).

Comprendre la diagenèse relève donc d'une dualité de pensée puisqu'il existe une différence de notion entre le fait de reconstruire un événement unique et comprendre cet événement dans le contexte d'un processus uniforme. En effet, en sciences médico-légales, les investigations cherchent à identifier les événements précédant la découverte du cadavre c'est-à-dire établir les causes de la mort, déterminer les relations causales entre les observations faites sur le corps ou le squelette et les mécanismes à leurs origines. Ces événements sont uniques et propres à chaque situation mais prennent place dans le processus plus global de la décomposition. On utilise donc le concept de l'**actualisme** en taphonomie qui associe des lois et des contextes spécifiques. Il part du postulat que les processus taphonomiques – les agents susceptibles de modifier les assemblages osseux – qui se sont exercés par le passé sont les mêmes que ceux qui s'exercent

actuellement. L'expérimentation permet donc, dans une certaine mesure, d'inférer le déroulement des événements antérieurs à la découverte d'un cadavre.

2.6.2. Processus

La diagenèse comprend des processus interdépendants de dissolution, de précipitation, d'adsorption, de substitution ionique (remplacement des minéraux) et de recristallisation (Pate *et al.* 1989 ; Elliott et Grime 1993).

Au sein du tissu osseux, la fraction minérale est intimement liée à la matrice collagénique. Dans les phases précoces de la diagenèse, il se produit une phase d'attaque microbienne du tissu osseux. Cette attaque serait la cause principale de la perte du collagène (Hedges 2002). Cependant, certains auteurs considèrent que cette attaque microbienne ne peut avoir lieu que si une partie de la matrice minérale a été enlevée pour permettre un accès à la fraction organique (Nielsen-Marsh *et al.* 2000b). On constate alors deux phénomènes parallèles, dépendant l'un de l'autre : (1) la dégradation de la quantité de collagène associée à sa dégradation qualitative (il est moins bien défini chimiquement) (Hedges *et al.* 1995) ; et (2) une augmentation de la cristallinité de la fraction minérale au fur et à mesure de la dégradation et de la perte du collagène. Ainsi, la perturbation de la trame cristalline – changement de taille et de forme des cristaux – facilite la décomposition de la fraction organique qui favorise à son tour l'altération de la structure cristalline.

La dégradation du collagène et des protéines ne se fait pas seulement par attaque microbienne. Des phénomènes de glycation et d'hydrolyse participent à la fragilisation de la molécule de collagène (vonEndt et Ortner 1984). Les dommages causés au collagène entraînent un changement dans son organisation et une segmentation des molécules de haut poids moléculaire en polypeptides plus petits, avec comme processus ultime sa gélatinisation et sa perte (Collins *et al.* 2002). La dégradation des acides aminés est donc différentielle : la proline et l'hydroxyproline – qui possèdent 5 atomes de carbone – voient leur quantité fortement diminuer alors que le profil du collagène pour les autres acides aminés apparaît non perturbé notamment pour la glycine – deux atomes de carbone – et l'alanine – trois atomes de carbone (Grupe 1995). Au cours de la phase d'attaque microbienne, la décomposition tissulaire entraîne la libération d'acides organiques qui initient la déminéralisation de l'os et la libération du collagène ; ils participent ainsi à la dissolution des minéraux d'apatite associés et à la destruction de la structure histologique (Pate *et al.* 1989 ; Collins *et al.* 2002).

Au niveau de la fraction minérale du tissu osseux, la diagenèse se manifeste donc par (1) une précipitation de sels hydro-solubles et la séparation des phases minérales, (2) des échanges ioniques entre le sol et les cristaux d'hydroxyapatite, (3) la recristallisation de la phase minérale

se traduisant par une conversion des microcristaux biogéniques d'hydroxyapatite en des cristaux d'hydroxyapatite plus importants et mieux cristallisés (Pate et Hutton 1988 ; Pate *et al.* 1989 ; King *et al.* 2011). La diagenèse entraîne donc l'incorporation de nouveaux éléments au sein de la structure cristalline via les pores ou les microfissures osseuses. Ces éléments peuvent se retrouver adsorbés à la surface ou au sein même du cristal d'hydroxyapatite (Elliott et Grime 1993).

2.6.3. Facteurs influençant la diagenèse

De nombreux paramètres vont influencer les phases initiales de la décomposition et donc les phases de la diagenèse qui suivra. Ainsi, Galloway et collaborateurs (Galloway *et al.* 1997) ont répertorié ces principaux paramètres et les ont différenciés en facteurs intrinsèques (*e.g.* densité osseuse, type d'os, masse de l'os) et extrinsèques (*e.g.* exposition au soleil, présence d'eau, pH du sol, activité des insectes et des carnivores). Cependant, les trois paramètres fondamentaux pour comprendre les phénomènes de la diagenèse sont le pH, la saturation de l'eau avec les ions calcium (Ca^{2+}) et phosphate (PO_4^{3-}), et la quantité de mouvement des eaux souterraines (Nielsen-Marsh *et al.* 2000a ; Collins *et al.* 2002), tous ces facteurs étant fortement corrélés.

L'hydroxyapatite est relativement peu soluble lorsque le pH est élevé, mais sa solubilité augmente au fur et à mesure que le pH diminue à 6,5 ou 6 et augmente rapidement en dessous de 6 (Nielsen-Marsh *et al.* 2000a ; Collins *et al.* 2002 ; Nielsen-Marsh *et al.* 2007). La dissolution intervient quand les conditions environnementales changent et que le milieu devient insaturé, soit à cause d'une diminution du pH ou quand le milieu se recharge en eau pure. À ce moment, l'eau et les minéraux contenus dans le sol se substituent dans la matrice cristalline fragilisant encore plus les liaisons organo-minérales (vonEndt et Ortnier 1984). Les ions exogènes se fixent en lieu et place des ions calcium Ca^{2+} , phosphate PO_4^{2-} ou carbonate CO_3^{2-} au sein de la matrice cristalline, ou à la surface de l'hydroxyapatite (Turner-Walker 2008).

2.6.4. Contamination

Nous venons de voir que des éléments extérieurs peuvent être adsorbés à la surface des os, ils peuvent alors migrer à l'intérieur de l'os pour remplir les vides laissés à la suite de la décomposition de la matière organique, et ils peuvent aussi remplacer les ions structuraux de la matrice cristalline ou être adsorbés à la surface du cristal. On parle alors de **contamination**. La diagenèse peut avoir lieu avec ou sans contamination. S'il y a une contamination, elle se produit principalement dans les 0,5 premiers millimètres de profondeur dans l'os. Si la contamination se produit durant une inhumation, elle ne dépend pas de la quantité d'éléments déjà présents. Elle

varie donc entre chaque échantillon en fonction des conditions d'inhumation (Lambert *et al.* 1989).

3. L'ESTIMATION DU DELAI *POST MORTEM*

En contexte médico-légal, que ce soit face à un cadavre³ ou à des restes humains squelettiques, une des grandes questions posées est la détermination du temps écoulé depuis le décès, encore appelée estimation de l'intervalle *post mortem*.

Dans toutes les méthodes publiées concernant la détermination de l'intervalle *post mortem*, nous pouvons distinguer deux catégories principales : celles relatives aux périodes récentes (lors de la décomposition des tissus mous de l'organisme) et celles concernant les périodes plus anciennes (phases de décomposition plus avancées, de squelettisation et d'atteintes taphonomiques des os) (Swift 2006) voire beaucoup plus anciennes pour les vestiges archéologiques.

3.1. ESTIMATION DES PHASES RECENTES DE L'INTERVALLE *POST MORTEM*

En l'absence de preuves documentées sur le moment de la mort (par exemple une vidéo de surveillance) les investigations pour estimer le délai *post mortem* reposent sur 3 principales sources d'informations additionnelles : (1) les preuves apportées par le corps lui-même ; (2) les preuves environnementales fondées sur des artefacts en association avec le corps ; et (3) les preuves anamnestiques basées sur la connaissance des mouvements et des activités de l'individu au jour le jour. Les investigations policières portent le plus souvent sur ces deux dernières sources et, de nombreuses méthodes ont été mises en place pour permettre d'estimer l'intervalle *post mortem* directement à partir du corps. La détermination de la chronologie des événements est d'une grande importance dans les investigations médico-légales puisque cette capacité de recréer l'emploi du temps théorique des derniers jours d'un individu permet d'incriminer ou d'éliminer des suspects potentiels lors d'une enquête (Swift 2006).

La littérature concernant l'estimation du délai *post mortem* à l'aide des phases précoces de la décomposition est vaste avec de nouvelles adaptations et mises à jour continues. Nous n'aborderons cependant pas toutes ces méthodes dans ce chapitre, nous détaillerons seulement les principaux changements survenant au sein du cadavre ayant fait l'objet de méthodes d'estimation de l'intervalle *post mortem*.

³ Corps ayant conservé une certaine intégrité physique avec préservation des tissus mous (cf. définition dans la Partie 2, page 91)

3.1.1. *Algor mortis*

Ce phénomène décrit la diminution de la **température corporelle** à la suite du décès. Les méthodes d'estimation du délai *post mortem* se fondant sur ce phénomène partent du postulat que la température corporelle durant la période *ante mortem* est constante (en dehors de toute atteinte pathologique), et est présumée à 37°C (Swift 2006). Après le décès, on observe une phase de plateau, de stagnation de la température au sein de l'organisme. Cette phase peut durer de 30 minutes à 3 heures et la cause de cette stase est inconnue. Ensuite la température de l'organisme décroît progressivement jusqu'à se stabiliser en fonction de la température ambiante.

La température est donc mesurée sur le cadavre, et de nombreux sites anatomiques peuvent être utilisés, les principales zones étant le cerveau, la surface de la peau, les cavités nasales, les cavités auriculaires, le creux axillaire, le rectum, les organes internes. La température corporelle varie en fonction du lieu où elle est relevée (orale, rectale, cérébrale, hépatique) entre chaque individu et au sein même d'un individu au cours de la journée, selon son activité ou son état de santé (Di Maio et Di Maio 2001). La diminution de température varie aussi dans chaque site à une vitesse différente.

La méthode d'estimation de l'intervalle *post mortem* la plus connue et la plus fréquemment utilisée a été établie par Henssge et Madea (2004) et utilise la température rectale. Les résultats sont interprétables sous la forme d'un nomogramme. Afin d'obtenir une estimation plus précise, il faut prendre en compte de nombreux paramètres tels que la variation de la température ambiante depuis l'exposition du corps, la ventilation autour du corps, les précipitations, la position du corps, la présence ou absence de vêtements, la corpulence de l'individu. Ces auteurs ont aussi adapté cette méthode avec l'utilisation de la température cérébrale.

Une autre méthode a été mise au point utilisant la température auriculaire. Elle part du principe que, durant la vie de l'individu, l'artère carotide interne irrigue la membrane tympanique de telle sorte que sa température est identique à celle du corps. Cependant cette méthode est affectée par la position de la tête, la ventilation du cadavre et les variations de température circadiennes naturelles durant la période *ante mortem*. Baccino et collaborateurs (1996) estiment cependant que l'utilisation de la température auriculaire est plus facile à mettre en œuvre et permet l'obtention de meilleurs résultats qu'avec la température rectale.

3.1.2. La rigidité cadavérique ou *rigor mortis*

La rigidité cadavérique ou *rigor mortis* correspond à la contraction *post mortem* progressive des fibres musculaires de l'organisme. Elle s'installe entre 3 et 6 heures après le décès et se maintient jusqu'à 36 heures, ensuite elle se dissipe (Swift 2006). Ce phénomène commence avec les muscles des paupières, de la nuque et des mâchoires, puis descend vers le tronc et les

membres. Il s'étend en 4 à 6 heures au reste du corps. La rigidité peut persister 24 à 48 heures avant de disparaître dans le même ordre (Gill-King 1997).

Physiologiquement, le muscle est composé de deux constituants majeurs – l'actine et la myosine – qui forment un sarcomère. L'interaction entre ces deux protéines produit une contraction des sarcomères et donc de la fibre musculaire, et par voie de conséquence du muscle en son entier. La relaxation musculaire se fait par hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine diphosphate (ADP) ce qui libère l'énergie nécessaire à la libération du complexe actine-myosine (Di Maio et Di Maio 2001). Grâce au glycogène, l'ATP est resynthétisée et permet de nouvelles contractions. À la mort de l'individu, les réserves en glycogène sont rapidement épuisées ce qui stoppe la libération des sarcomères et entraîne la rigidité cadavérique. Lorsque l'autolyse commence, la composante ultra-structurale cellulaire perd son intégrité, et la rigidité ne peut plus être maintenue (Gill-King 1997).

La rigidité apparaît séquencée c'est-à-dire descendant du haut du corps vers les membres, ce qui s'expliquerait par la proportion relative en fibres rouges et blanches de chaque muscle, par les caractéristiques dynamiques de chaque articulation et par les différences de température entre muscles. Néanmoins, ce phénomène est difficile à utiliser pour estimer l'intervalle *post mortem* car de nombreux facteurs interviennent tels la température de l'environnement, l'activité musculaire juste avant le décès, l'âge du sujet, le poids et la surface corporelle de l'individu (Gill-King 1997). Cependant, les facteurs les plus importants affectant le début de la rigidité et sa durée sont la température ambiante et l'état métabolique au moment du décès. Les faibles températures accélèrent son apparition et augmentent sa durée, alors que les températures importantes retardent son apparition. Si le décès se produit après une longue agonie, ou avec de la fièvre, son apparition est accélérée probablement à cause de la quantité plus importante d'acide lactique présent dans l'organisme.

3.1.3. Les lividités cadavériques ou *livor mortis*

Les lividités cadavériques ou hypostase ou *livor mortis* correspondent aux colorations rouges violacées créées en l'absence de circulation cardiovasculaire par l'action de la gravité sur les accumulations de sang dans les petits vaisseaux cutanés ou viscéraux (Figure 11). Les colorations sont dépendantes des conditions *peri mortem* mais aussi du délai *post mortem* d'où la tentative de créer une classification de ces lividités : débutante, confluyente, intensité maximale, léger déplacement à la pression, déplacement complet, déplacement incomplet. L'utilisation d'un colorimètre permet d'estimer un intervalle *post mortem* jusque dans les 48 heures suivant la mort. Cependant, la vitesse d'apparition, la coloration, la distribution et les possibles redistributions de l'hypostase sont tellement variables que leurs utilisations s'avèrent purement théoriques et ne sont pas adaptées à un examen approfondi dans les affaires médico-légales

(Swift 2006). De plus, les lividités peuvent occasionnellement être mal interprétées en contusions par des personnes non habituées à ce genre de phénomène.



Figure 11 – Lividités cadavériques

(In : Beauthier 2011)

3.1.4. Changements ophtalmologiques

Les méthodes utilisant les organes oculaires sont nombreuses allant de la mesure de la pression intraoculaire (jusqu'à 6 heures après le décès), à la visualisation des vaisseaux réiniens (peu probant pour l'estimation de l'intervalle *post mortem*). Certaines méthodes ont utilisé le reflexe de contraction de l'iris qui peut perdurer dans les périodes *post mortem* récentes lorsqu'on applique une charge électrique ou une stimulation pharmaceutique. Ces techniques sont utilisées dans les deux premiers jours après la mort (Swift 2006).

Au niveau oculaire, dans les 24 heures suivant le décès et lorsque les paupières ne sont pas closes, on observe l'apparition d'une tache noire sclérale de part et d'autre de l'iris, ainsi qu'une opacification de la cornée. Ces deux phénomènes sont liés à la dessiccation des tissus oculaires (Beauthier 2011).

3.1.5. Changements biochimiques et hématologiques

L'analyse de prélèvements sanguins n'apporte aucune information sur l'intervalle *post mortem*. En effet, après le décès, les électrolytes sont redistribués à la suite de la perte de l'intégrité cellulaire et à l'arrêt des transports transmembranaires. Les concentrations en électrolytes majeurs (potassium et sodium) sont donc modifiées. Les cellules sanguines elles-mêmes peuvent présenter des altérations morphologiques (Swift 2006).

Les méthodes cherchant à doser ces changements biochimiques et hématologiques se sont donc focalisées sur les milieux de l'organisme considérés comme clos. Ainsi, l'analyse de la concentration en potassium de l'humeur vitrée de l'œil a souvent été étudiée. Cette méthode date de plus de 40 ans et demeure encore aujourd'hui controversée. Le postulat de départ est que le globe oculaire forme un environnement clos séparé du reste du corps mais qui reste influencé par la température ambiante. Les altérations apparaissent alors prévisibles et permettent d'estimer l'intervalle *post mortem*. La concentration en potassium dans le globe oculaire augmente au fur et à mesure de sa libération par les cellules intraoculaires à la suite de la perte du transport transmembranaire, créant ainsi une augmentation exponentielle (Sparks *et al.* 1989 ; Madea et Rödiger 2006).

Des méthodes similaires ont été élaborées sur l'étude de la biochimie du liquide cérébro-spinal et des fluides synoviaux qui sont tous deux des environnements clos (Madea 2005 ; Swift 2006).

3.1.6. Dégradation de l'ADN et changements ultrastructuraux

Du vivant de l'individu, l'intégrité de l'ADN est assurée par des mécanismes de réparation enzymatique continue (Pääbo *et al.* 2004). Avec l'arrêt de la circulation sanguine et la mort cellulaire, les composants de la structure cellulaire subissent alors une altération autolytique. Sous l'action d'enzymes telles les nucléases lysosomales, l'ADN se fragmente en brins de petites longueurs (Willerslev et Cooper 2005) dont la taille moléculaire est dépendante du temps (Perry *et al.* 1988). La même approche peut être faite avec l'ARN messager. La cytométrie de flux peut permettre une quantification de cette dégradation au niveau de la rate ou de la pulpe dentaire mais les résultats apparaissent contradictoires. Les résultats obtenus pour les intervalles *post mortem* courts (inférieurs à 72 heures) apparaissent plus prometteurs que ceux obtenus à partir d'os anciens (plusieurs années). De plus, ce taux de dégradation ne semble pas spécifique à l'individu mais plutôt dépendant de la température ambiante et de l'humidité (Swift 2006 ; Kaiser *et al.* 2008).

3.1.7. Changements morphologiques

Les changements morphologiques observés dans les jours suivant le décès sont souvent utilisés pour estimer l'intervalle *post mortem* (cf. Tableau 2 page 54). La chronologie de ces changements peut permettre de se faire une idée du délai écoulé depuis le décès mais il existe beaucoup de variables à prendre en compte avant toute estimation comme, par exemple, la température, le degré d'humidité (Swift 2006). Ces changements morphologiques ne sont que rarement utilisés seuls et sont souvent associés aux méthodes entomologiques.

3.1.8. Méthodes entomologiques

Les méthodes entomologiques permettent de faire la transition entre les périodes récentes et tardives dans l'estimation de l'intervalle *post mortem*. Elles reposent sur l'identification de l'espèce d'un insecte, de son stade de développement, et de la succession d'espèces retrouvées sur et/ou au voisinage du corps.

Les diptères (mouches par exemple) ont un cycle de maturation connu allant des phases de maturation larvaire, à la pupation et au diptère adulte. De même, l'identification des espèces qui se succèdent permet d'obtenir des informations supplémentaires pour estimer l'intervalle *post mortem*. Cependant, les périodes de temps fournies par ces observations varient, entre autres, selon la température, l'humidité, la cause de la mort, et la présence ou l'absence de drogues dans l'organisme. L'utilisation du concept de « degré-jour accumulé » permet d'obtenir une estimation de l'intervalle *post mortem* plus précise (Swift 2006).

3.1.9. Synthèse sur l'estimation des intervalles *post mortem* courts

L'estimation de l'intervalle *post mortem* perd en précision au fur et à mesure que le délai augmente. En effet, les processus impliqués sont complexes, spécifiques d'un contexte et se chevauchent parfois dans le temps ; à cela s'ajoute une corrélation au temps écoulé non absolue (Clark *et al.* 1997 ; Haglund et Sorg 1997a). Devant la multitude de facteurs impliqués, certains auteurs considèrent qu'il est impossible d'attribuer un intervalle de temps crédible à chaque stade de la décomposition (Pinheiro 2006).

3.2. ESTIMATION DES PHASES TARDIVES DE L'INTERVALLE POST MORTEM

Lors de la découverte de squelettes ou d'os humains, répondre à la question de la datation de la mort est capital puisque des restes osseux humains peuvent appartenir à la sphère archéologique ou historique, ou avoir un intérêt médico-légal. Dans ce dernier cas, le délai écoulé depuis le décès conditionnera l'action judiciaire à engager. En effet, dans le droit pénal français, en matière de crime, « *l'action publique se prescrit par dix années révolues à compter du jour où le crime a été commis [ou] après dix années révolues à compter du dernier acte [d'instruction ou de poursuite]* »⁴. Cette durée de prescriptibilité, si le crime est commis sur des mineurs, est de « *vingt ans et ne commence à courir qu'à partir de la majorité de ces derniers* »⁴. Néanmoins, il faut aussi prendre en compte la particularité des crimes contre l'humanité où l'action publique ainsi que les peines prononcées sont imprescriptibles⁵.

⁴ Code de procédure pénale, article 7.

⁵ Code pénal, article 213-5.

Suivant l'âge de la victime (individu mineur ou majeur), les circonstances de réalisation du crime (crime contre l'humanité) et selon les actes de procédures déjà réalisés (informations pouvant ne pas être connues des enquêteurs en cas de victime non identifiée), l'estimation de l'intervalle *post mortem* devra être suffisamment précise et fiable, et ce sur une période suffisamment longue, pour décider de la nécessité de réaliser ou non des investigations.

Pour la communauté médico-légale internationale, l'intervalle *post mortem* « seuil » permettant de différencier des os archéologiques ou historiques d'os modernes est compris entre 50 et 75 ans voire 100 ans (Knight 1968 ; Knight et Lauder 1969 ; Nokes *et al.* 1987 ; MacLaughlin-Black *et al.* 1992 ; Introna *et al.* 1999 ; Ubelaker 2001 ; Forbes 2004 ; Swift 2006 ; Creamer et Buck 2009 ; Ramsthaler *et al.* 2011), délai après lequel il ne subsiste que peu de probabilités que la personne coupable du crime soit toujours vivante.

Les méthodes d'estimation de l'intervalle *post mortem* existantes sont établies selon deux schémas : la **généralisation d'études de cas** et l'**expérimentation**, chacune possédant ses avantages et ses inconvénients. D'une part, les études expérimentales permettent d'isoler et de contrôler les paramètres intervenant dans la décomposition, ce qui permet une meilleure compréhension des événements. Ce contrôle induit une simplification des phénomènes liés à la décomposition, simplification qui ne prend pas en compte la complexité des processus naturels. D'autre part, les études de cas évitent ces derniers biais mais ne permettent pas un contrôle aussi rigoureux des conditions de décomposition (Haglund et Sorg 1997a).

Cette sous-partie a pour vocation de fournir un aperçu rapide des méthodes d'estimation de l'intervalle *post mortem* à partir des restes osseux humains.

3.2.1. Datation des indices et matériels associés au corps

3.2.1.1. Indices botaniques

Les plantes se développent dans des habitats qui sont régis par la nature du sol, la température, le vent, l'humidité, l'altitude, la latitude et la longitude. Les plantes peuvent ensuite se retrouver sous forme d'associations qui sont plus ou moins étendues géographiquement (Hall 1997). La palynologie et la botanique peuvent donc aider dans les investigations médico-légales car la reconnaissance d'une espèce de pollen ou de plante sur les vêtements ou le corps d'une victime permet, par exemple, d'identifier une saison d'exposition ou une zone géographique (Swift 2006). De plus, les plantes sont un indicateur du temps car elles sont attachées de manière permanente à un substrat (le sol), et leur schéma ainsi que leur taux de croissance sont connus (Cardoso *et al.* 2010).

Les indices botaniques retrouvés au contact du corps peuvent être convertis en intervalle *post mortem* minimum, on parle de minimum car on ne peut pas définir avec précision la période à laquelle la colonisation du corps, ou du sol recouvrant le corps, par cette plante s'est initiée. L'estimation se fait par l'étude de la croissance des plantes ou par le décompte des anneaux concentriques de croissance annuelle du système racinaire (Hall 1997 ; Swift 2006).

Cette méthode, bien que très intéressante, permet de compléter l'estimation faite avec d'autres indicateurs mais elle ne peut être employée seule car de nombreuses variations peuvent exister en fonction de l'espèce végétale considérée, du mode de croissance de la plante qui peut être irrégulier. Ces biais peuvent en partie être contrôlés par le déplacement de l'expert sur le lieu de découverte des os, la collecte des informations *in situ* permettra d'affiner l'interprétation des résultats.

3.2.1.2. Structures de recouvrement et artefacts associés

Lorsque la découverte du cadavre se fait à l'intérieur d'une habitation ou en relation étroite avec des structures architecturales, il est possible d'estimer un intervalle *post mortem* minimum qui sera la date à laquelle la structure (par exemple une dalle de béton, un pilier de pont) a été construite. De nombreux exemples sont cités dans la presse de squelettes d'intérêt archéologique qui sont découverts dans les caves ou les jardins chaque année sans qu'aucun acte criminel n'en soit à l'origine^{6, 7} mais parfois le doute persiste⁸.

Connaître l'année de construction d'un aménagement ou d'une structure architecturale permet aussi de faire des recherches plus ciblées lorsque un événement précis est recherché. On utilise alors les principes de la **stratigraphie**. Nous pouvons alors citer comme exemple le plus probant, les recherches qui sont en cours dans le périmètre du World Trade Center (New York, U.S.A.). En effet, depuis 2008, des campagnes de fouilles sont menées dans l'environnement immédiat des anciennes tours afin de mettre au jour de potentiels restes humains. Pour ce faire, les anthropologues réalisent une fouille méthodique par carré, en tenant compte de la stratigraphie urbaine. Sur le substrat originel (bitume présent préalablement aux attentats) se trouve une couche de sédiments et de débris résultant de l'effondrement des tours contenant potentiellement des vestiges humains, puis une nouvelle couche de bitume déposée postérieurement aux événements. Cette stratigraphie particulière permet de cibler spécifiquement la période chronologique d'intérêt pour la recherche de restes humains (Gill *et al.* 2011).

⁶ Thierry Dupuy « Un squelette très ancien retrouvé dans la cave d'une maison », 11 septembre 2013, www.ladepeche.fr (page consultée le 29/10/2013).

⁷ Mélanie Ferhallad « L'histoire : un squelette vieux d'un siècle déterré dans leur jardin », 15 août 2008, www.laprovence.com (page consultée le 29/10/2013).

⁸ Le Parisien « Un squelette de femme retrouvé dans une cave », 13 mai 2005, www.leparisien.fr (page consultée le 29/10/2013).

3.2.2. Méthodes spécifiques à l'os

3.2.2.1. Observation de critères macroscopiques

Ces méthodes sont non invasives et ne nécessitent pas d'atteinte à l'intégrité de la pièce anatomique étudiée. Elles reposent sur l'examen visuel des restes osseux et des éventuelles traces de tissus mous rattachés. La squelettisation est le mode de décomposition du corps le plus fréquent par opposition aux phénomènes de formation d'adipocire et de momification qui entraînent une conservation des tissus mous (Pinheiro 2006).

Il existe de nombreuses études proposant des estimations de l'intervalle *post mortem* en fonction de la vitesse de décomposition des tissus mous. Le plus souvent ces méthodes sont dépendantes d'une zone géographique très précise et il devient difficile de généraliser les observations dans un contexte extérieur. La classification des différents stades de décomposition établie par Galloway et collaborateurs (1989) (cf. Tableau 2 page 54) est souvent reprise dans les études sur l'estimation de l'intervalle *post mortem*.

Afin de pouvoir comparer les différentes études et les différents temps de décomposition entre eux, les chercheurs ont réalisé leurs observations en fonction de la température journalière accumulée, principe déjà largement employé en entomologie médico-légale (Rodriguez et Bass 1985 ; Galloway *et al.* 1989 ; Bass 1997 ; Komar 1998 ; Prieto *et al.* 2004 ; Fitzgerald et Oxenham 2009 ; Ross et Cunningham 2011), puis en tenant compte de la décomposition différentielle des différentes parties du corps humain, chaque segment corporel se voyant attribué un stade de décomposition propre (Megyesi *et al.* 2005). Cette démarche permet d'avoir un protocole d'étude des os plus objectif et permet donc la comparaison directe entre différentes études. Les estimations obtenues sont relativement précises pour les premières phases de décomposition du corps et ce jusqu'au début de la squelettisation qui, dans les climats tempérés, apparaît généralement dès 6 mois de délai *post mortem*. Cependant, lorsque les derniers vestiges de tissus mous ont disparu, ces méthodes ne sont plus applicables.

L'utilisation de ces méthodes d'estimation de l'intervalle *post mortem* en France à partir des stades de décomposition des tissus mous doit être envisagée avec précaution. En effet, il faudrait réaliser des études similaires afin de vérifier que ces observations et ces taux de décomposition sont valables sous nos latitudes et notre climat.

3.2.2.2. Observation de critères microscopiques

Les méthodes d'estimation de l'intervalle *post mortem* fondées sur l'observation de critères microscopiques cherchent à mettre en évidence les phénomènes de dégradation de la matrice

minérale au sein du tissu osseux. Ces méthodes nécessitent la réalisation de coupes ou de prélèvements des restes osseux entraînant ainsi une destruction partielle des pièces anatomiques.

Au cours de la décomposition et de la diagenèse, on constate une dissolution de la trame minérale offrant ainsi un accès aux attaques microbiennes qui dégradent la phase organique au sein de cette matrice minérale (molécules de collagène et fraction lipidique) (Collins *et al.* 2002). Les espaces vacants sont alors comblés par une recristallisation d'hydroxyapatite (composé endogène) ou par la précipitation de minéraux présents dans le sol (contamination par des composés exogènes) (Turner-Walker 2008). Il est très difficile de dater ces phénomènes car, par définition, ils sont dépendants des conditions de conservation que ce soit la nature du milieu dans lequel les os reposent, la composition et le mouvement de l'eau, la nature et le pH du sol (Grupe 1995 ; Nielsen-Marsh *et al.* 2000a).

La méthode d'estimation du délai *post mortem* proposée par Berg (1963) repose sur l'observation sous microscope et avec une lumière polarisée d'une section d'os décalcifié. Cette technique permet de mettre en évidence les minéralisations secondaires associées à une décomposition alvéolaire sur des os anciens (délais *post mortem* supérieurs à 70-100 ans). Le même auteur propose aussi de rechercher la présence de matière grasse à l'intérieur du système haversien qui signe une dégradation de la moelle osseuse et sa diffusion au sein de l'os, indice en faveur d'un intervalle *post mortem* inférieur à 50 ans.

Cependant, ces observations, même si elles attestent que les os étudiés ne sont pas récents, ne permettent pas non plus d'estimer un intervalle *post mortem* avec précision. En effet, les phénomènes de dissolution, d'attaque bactérienne et de recristallisation de la matrice cristalline sont plus dépendants des conditions environnementales de conservation des os que du délai *post mortem* en lui-même (Nokes *et al.* 1987). Concernant la dispersion intra-osseuse de la matière grasse, elle est dépendante de la densité osseuse et donc de l'âge de l'individu (Berg 1963). Les méthodes reposant sur ces observations ne permettent donc pas une estimation précise et fiable de l'intervalle *post mortem*. La mise en évidence de tous ces éléments (augmentation de la cristallinité, dissolution de la matrice minérale) montre que ce sont donc des témoins des phénomènes de la diagenèse mais pas des indicateurs utiles pour l'estimation du délai *post mortem* (Lambert *et al.* 1982).

3.2.2.3. Méthodes analytiques

Les méthodes analytiques ont pour buts de reconnaître, détecter et caractériser les changements physico-chimiques du tissu osseux en fonction du délai *post mortem*. Dans un premier temps, nous détaillerons les méthodes étudiant les changements physico-chimiques

secondaires à la décomposition, puis, dans un second temps, nous verrons plus particulièrement les méthodes mesurant les altérations de concentration en radio-isotopes (Swift 2006).

3.2.2.3.1. Changements physico-chimiques et sérologiques

Coloration au Bleu de Nil (hydrogénosulfate) et à l'indophénol

Ces méthodes consistent, que ce soit pour l'indophénol ou le bleu de Nil, à colorer une coupe fine d'os d'environ 1 à 1,5 mm d'épaisseur. La coloration à l'indophénol permet de mettre en évidence les composés azotés présents dans l'os, ce composé a donc une grande affinité pour les acides aminés présents dans les os récents. À l'opposé, le bleu de Nil s'imprègne plus dans la matrice osseuse ayant perdu une partie de sa fraction organique (Figure 12). La perte d'affinité pour l'indophénol est donc liée à une augmentation de la susceptibilité pour la rétention du bleu de Nil (Berg 1963). Malheureusement, ces méthodes présentent des résultats irréguliers (mauvaise reproductibilité) du fait de la difficulté d'évaluation de la coloration rendant l'estimation imprécise et non fiable. Certains auteurs considèrent donc qu'elles n'ont aucune valeur pratique (Knight et Lauder 1969).

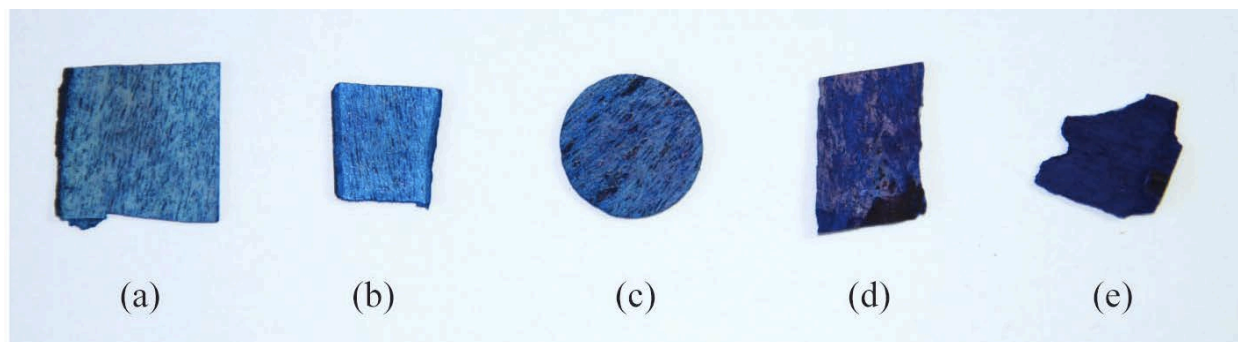


Figure 12 – Exemples d'os de différents intervalles *post mortem* colorés au bleu de Nil

(a) 15 ans ; (b) 25 ans ; (c) 70 ans ; (d) 110 ans ; (e) 6 000 ans

Pour pallier ces erreurs de reproductibilité, un protocole standardisé a été mis au point à l'Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie Nationale (Rosny-sous-bois, France) pour la méthode utilisant la coloration au bleu de Nil. La mesure de la teinte est effectuée à l'aide d'un colorimètre sur deux séries d'échantillons issues d'un même os – une colorée et l'autre non colorée – afin de s'affranchir de la coloration naturelle de l'os qui est dépendante du milieu de conservation. Ces mesures sont répétées 30 fois sur chaque section pour obtenir une teinte moyenne de l'os étudié. Une équation polynomiale permet ensuite d'obtenir une estimation de

l'intervalle *post mortem* assorti d'un écart-type en années lequel augmente avec l'augmentation de l'intervalle *post mortem* estimé (Beauthier *et al.* 2011).

Cette méthode présente donc un intérêt pour différencier les os archéologiques des os médico-légaux. Il faut néanmoins garder à l'esprit que les conditions environnementales de conservation du corps peuvent biaiser les observations.

Détection de l'hémoglobine

À la mort de l'individu, le sang contenu dans le tissu osseux va commencer à se dégrader. L'os, en tant que tissu rigide et résistant, va permettre une conservation des résidus de cette dégradation (hème et hémoglobine) sur plusieurs années. De nombreuses études (Introna *et al.* 1999 ; Saukko et Knight 2004 ; Creamer et Buck 2009 ; Ramsthaler *et al.* 2011) ont donc été menées afin de mesurer la corrélation existant entre la teneur en hémoglobine résiduelle et l'intervalle *post mortem*.

Les méthodes développées actuellement utilisent le luminol, produit chimique déjà largement employé en criminalistique pour la détection des traces de sang. Ce produit présente une chimiluminescence bleue caractéristique lorsqu'il est mis en présence d'un catalyseur adéquat tel le fer contenu dans l'hème. Cette lumière bleue-blanc est visible dans le noir et cette réaction présente une grande sensibilité (de 1/100 000 à 1/5 000 000) selon les traitements préalables effectués sur les traces de sang suspectées (Introna *et al.* 1999). La méthode d'estimation de l'intervalle *post mortem* repose sur la détermination de la perte de luminosité qui est proportionnelle au temps écoulé depuis le décès (Introna *et al.* 1999). Cette méthode nécessite une petite quantité de poudre d'os qui sera traitée par luminol. Comme pour la coloration au bleu de Nil, la mesure de la luminescence s'effectue à l'aide d'une caméra afin de la rendre plus reproductible. Une luminescence intense est retrouvée pour des intervalles *post mortem* compris entre un mois et trois ans. La luminescence décroît au fur et à mesure de l'augmentation du délai *post mortem* et elle devient absente au delà de 60 ans. Le protocole d'étude a été repris par Creamer et Buck (2009) afin d'améliorer cette technique, de déterminer les variations au sein d'un même individu et au sein d'un même os. Certains auteurs (Saukko et Knight 2004) affirment retrouver des résidus d'hémoglobine jusqu'à des délais *post mortem* de 100 ans voire plus (Ramsthaler *et al.* 2011). Cependant des faux positifs peuvent être attribués, non pas à la détection de résidus de l'hème, mais à une contamination diagénétique des os en fonction des conditions d'enfouissement du corps ou à la détection d'autres composés que le sang réagissant aussi avec le luminol (*e.g.* cuivre, eau de javel). Cette méthode est donc plus fiable pour discriminer des os archéologiques des os d'intérêt médico-légal.

Fluorescence des os

L'os, en section, présente une fluorescence naturelle lorsqu'il est placé sous une lumière ultra-violette. Cette fluorescence est due à la teneur en matière organique de l'os (*e.g.* acides aminés aromatiques) et s'estompe avec le temps (Swift 2006). Cette approche est très dépendante du type d'os choisi et de l'épaisseur de la corticale. On ne peut donc pas l'utiliser sur des os tels le bloc crânio-facial ou les côtes qui ne présentent pas une corticale d'épaisseur suffisante permettant d'identifier un archétype de fluorescence (Knight et Lauder 1969). La perte de la fluorescence s'effectue d'abord sur les surfaces corticales externe et interne, avec maintien d'une fluorescence centrale (effet sandwich). Les auteurs ayant utilisé cette méthode comme indicateur de l'intervalle *post mortem* notent que, si la fluorescence concerne la totalité de la surface de coupe, le délai *post mortem* est inférieur à 100 ans (Berg 1963 ; Saukko et Knight 2004). En revanche, en cas de diminution importante de cette fluorescence, l'intervalle *post mortem* est supérieur à 50 ans (Ramsthaler *et al.* 2011).

Persistance de l'activité sérologique et immunologique

Après le décès, les résidus sanguins conservent une activité sérologique et immunologique. Quelques auteurs (Berg 1963 ; Knight 1968) ont proposé de tester la persistance de cette activité (détermination de la vitesse de réaction du sérum antiglobuline humaine) afin d'estimer un intervalle *post mortem*. Berg (Berg 1963) propose une estimation pour des intervalles *post mortem* inférieurs à 20 ans alors que Knight (Knight 1968) ne retrouve aucune activité sérologique sur des os datés d'à peine 5 ans.

Ces méthodes ont rapidement été abandonnées car les résultats ne présentent aucune fiabilité, précision ou reproductibilité.

Teneur en azote et en acides aminés

La teneur en azote et en acides aminés contenus dans les os permet d'avoir une estimation de la teneur en protéines résiduelles. Les acides aminés sont les principales molécules contenant de l'azote dans la phase organique du tissu osseux : la perte progressive des protéines au cours de la décomposition entraîne donc une perte de la teneur en azote. L'os compact frais contient environ 4,5 % d'azote et cette proportion diminue avec le délai *post mortem* (Saukko et Knight 2004). On peut considérer que si un os possède plus de 4 % de la masse d'azote, il ne doit pas être daté de plus de 100 ans, et s'il possède moins de 2,5 % de la masse d'azote, il doit être daté de plus de 350 ans (Knight 1968).

L'étude des acides aminés contenus dans le collagène pris individuellement permet de mettre en évidence une corrélation plus importante de certains acides aminés (proline et hydroxyproline) avec l'intervalle *post mortem* par rapport à d'autres acides aminés (glycine et alanine) même si ces derniers se retrouvent en proportion plus importante dans la fraction organique de l'os. Pour Knight et Lauder (1969), on ne retrouve plus de résidus de proline et d'hydroxyproline au delà de 50 années de délai *post mortem* alors que la glycine, elle, est un acide aminé qui peut persister pendant des millénaires (Saukko et Knight 2004). Certains auteurs retrouvent cependant des traces d'hydroxyproline dans des os datant de plusieurs milliers d'années (Marom *et al.* 2012). Parallèlement à la perte des protéines, on observe aussi une perte de la quantité de triglycérides et de cholestérol qui peut être corrélée au temps (Castellano *et al.* 1984). La datation des os humains peut donc être envisagée par la quantification de la perte de la matière organique (protéines et dans une moindre mesure, les lipides). Cependant, comme pour toutes les méthodes vues précédemment, les conditions de conservation du squelette affectent la vitesse et le taux de dégradation de la matière organique.

Teneur en citrate

Le citrate est une molécule intéressante qui est retrouvée en concentration constante dans le tissu osseux des individus vivants, indépendamment de l'âge et du sexe (Knuuttila *et al.* 1985). Une étude récente (Schwarcz *et al.* 2010) met en évidence une diminution graduelle de la teneur en citrate contenu dans l'os et, pour des os humains de plus de 100 ans de délai *post mortem*, elle finit par représenter moins de 1 % du citrate initial. Cette méthode, bien que peu utilisée, semble prometteuse.

3.2.2.3.2. Analyses radio-isotopiques

Elles se fondent sur la désintégration radioactive des atomes selon une décroissance exponentielle en fonction du temps. Cette décroissance est caractérisée par la demi-vie ou période radioactive de l'atome qui correspond au temps nécessaire à la désintégration de la moitié des atomes radioactifs. Au fur et à mesure de la désintégration du noyau initial la concentration en noyau fils (produit de la dégradation) augmente, il peut s'agir d'un même noyau plus stable ou d'un noyau chimiquement différents.

Selon les atomes considérés, les périodes radioactives peuvent être plus ou moins longues, de quelques microsecondes à plusieurs milliers d'années. Afin qu'un radio-isotope soit intéressant en contexte médico-légal, il doit présenter une demi-vie courte correspondant aux intervalles *post mortem* d'intérêt, être présent en quantité suffisante pour rendre sa détection plus facile, être incorporé au sein du tissu osseux via son rôle dans une ou des fonctions métaboliques, et avoir

une teneur stable dans l'organisme (Swift *et al.* 2001). Ainsi, au décès de l'individu, l'apport du radio-isotope cesse et sa décroissance radioactive débute. En enregistrant cette décroissance, on peut ainsi estimer le délai *post mortem*.

Carbone-14

Le radiocarbone ou carbone-14 est un isotope naturel du carbone-12. Il se retrouve au sein des organismes vivants via la chaîne alimentaire, et sa concentration est considérée comme constante au cours de la vie des individus (concentration naturelle inférieure à 10^{-9}). À la mort, les fonctions métaboliques cessent et une décroissance régulière de la teneur en carbone-14 apparaît (Figure 13) (Swift 2006).

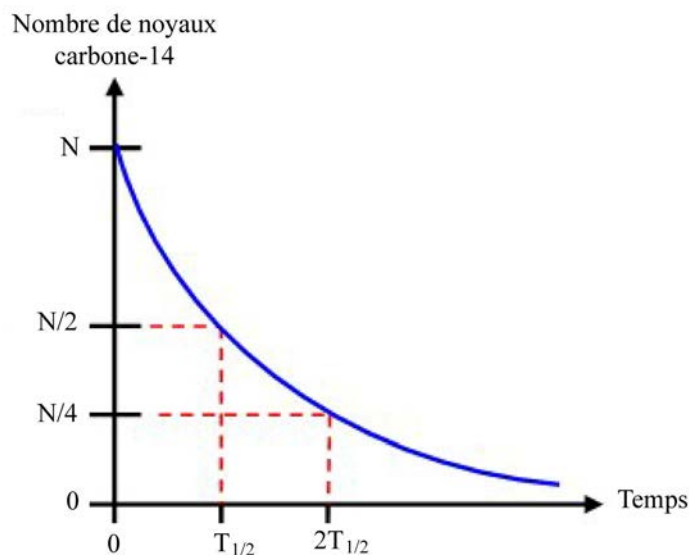


Figure 13 – Courbe de décroissance radioactive du carbone-14

N : Nombre de noyaux de carbone-14 à $t = 0$; $T_{1/2}$: durée de demi-vie du carbone-14

La datation carbone-14 part du postulat que les concentrations atmosphériques de cet élément ont été stables pendant des millénaires ce qui autorise une corrélation directe entre la teneur en carbone-14 et l'âge de l'échantillon. Ayant une demi-vie longue (5734 ± 40 ans), son emploi s'est essentiellement développé dans des problématiques de datations archéologiques à partir des atomes de carbone-14 contenus dans la matière organique (collagène), qui présente une meilleure préservation lorsque les conditions de conservation sont favorables. En effet, les atomes de carbones contenus dans la bio-hydroxyapatite sont plus susceptibles aux altérations diagénétiques qui se manifestent par une incorporation de carbonates provenant de

l'environnement au sein des cristaux d'hydroxyapatite pendant les phases de recristallisation. Cependant, dans les régions arides ou semi-arides ou pour les os crévés par exemple, le collagène n'est pas préservé et le carbonate de la bio-hydroxyapatite est alors la seule source de carbone permettant une datation radiocarbone (Zazzo et Saliège 2011).

Cependant des variations des concentrations atmosphériques ont rendu nécessaire l'emploi d'une courbe de calibration. En effet, avec le développement de l'aire industrielle (dès le XVIII^e s.), l'utilisation des énergies fossiles a libéré dans l'atmosphère une grande quantité de carbone-12 entraînant ainsi une dilution, une diminution de la concentration atmosphérique en carbone-14. Inversement, les essais nucléaires débutés en 1945 ont engendré une concentration atmosphérique plus importante de carbone-14 avec une concentration maximale appelée « pic nucléaire » atteinte en 1963, année de la signature du Traité d'interdiction partielle des essais nucléaires. Les taux actuels de carbone-14 sont toujours supérieurs à ceux relevés avant 1963.

De nombreux auteurs ont développé des méthodes d'estimation de l'intervalle *post mortem* fondées sur l'existence de ce « pic nucléaire » de 1963. Ainsi Ubelaker, dès 2001 (Ubelaker 2001), propose une méthode permettant de situer le décès des individus par rapport à ce pic. Sa méthodologie repose sur le prélèvement d'une dent (marqueur de la teneur carbone-14 dans l'enfance de l'individu), de tissus osseux trabéculaire et cortical (témoin du remodelage osseux et donc enregistrant le signal des dernières années de la vie de l'individu). Ces trois prélèvements permettent de situer l'individu sur la courbe et d'estimer un délai *post mortem* (Ubelaker *et al.* 2006 ; Ubelaker et Parra 2011).

Des précautions sont à prendre en fonction de l'âge au décès (les sujets immatures présentant un remodelage osseux plus rapide que les sujets âgés) et du type de tissu analysé (remodelage plus rapide pour l'os trabéculaire que pour l'os cortical). L'estimation de l'intervalle *post mortem* requiert donc la réalisation de trois analyses radiocarbone ce qui représente un coût financier non négligeable. De plus, les concentrations atmosphériques en carbone-14 diffèrent légèrement selon la zone géographique considérée et donc selon l'origine de l'individu.

Radio-isotopes artificiels

Les essais nucléaires atmosphériques des années 1945-1980 ont, en plus de la libération de carbone-14, relâché dans l'atmosphère des isotopes des métaux alcalino-terreux tel le strontium-90. Cet atome présente des propriétés biochimiques similaires à celles du calcium lui permettant une incorporation au sein de la matrice squelettique même s'il ne joue aucun rôle dans les fonctions métaboliques du tissu osseux. La demi-vie du strontium-90 est relativement courte (28,1 ans) ce qui rend potentiellement l'estimation du délai *post mortem* par ce radio-

isotope intéressante. En effet, cet isotope s'est retrouvé présent dans l'atmosphère après 1945 et ne devrait donc pas être retrouvé chez des individus décédés avant cette date.

Des auteurs (MacLaughlin-Black *et al.* 1992 ; Neis *et al.* 1999) ont donc tenté de développer une nouvelle méthode d'estimation de l'intervalle *post mortem* par analyse de cet élément. Malgré le potentiel intéressant du strontium-90, ils ont mis en évidence une influence trop importante de l'alimentation, via la zone géographique et le régime alimentaire, sur les concentrations retrouvées au sein du tissu osseux des individus. De même, il existe une contamination des os par les eaux de pluie qui ruissèlent sur le corps ou s'infiltrant dans le sol (Neis *et al.* 1999). Ainsi sur des os attestés archéologiques, des teneurs en strontium-90 inattendues ont été enregistrées, elles sont imputables aux phénomènes de diagenèse et à la percolation du radio-strontium jusqu'aux os par les eaux de pluie.

L'utilisation de ce radio-isotope peut donc s'avérer incertaine et devrait être évitée si de nombreuses informations ne peuvent pas être collectées concernant les conditions diagénétiques, la zone géographique concernée, voire éventuellement le régime alimentaire de l'individu.

Radio-isotopes naturels

Les isotopes naturels se retrouvent présents dans l'organisme via la chaîne alimentaire et l'eau de boisson, voire via la respiration. Considérant que ces éléments ne sont pas dépendants des explosions nucléaires, leur consommation devrait être constante au cours de la vie des individus. De plus, ces isotopes ont des concentrations atmosphériques stables et prédictibles qui sont restées inchangées au cours du dernier millénaire. Cela concerne les isotopes du plomb (plomb-210) et du polonium (polonium-210) qui font partie de la série de décroissance radioactive de l'uranium-238 (Swift 2006). Le plomb-210 et le strontium-90 ont des comportements similaires que ce soit au niveau de leur présence dans l'atmosphère ou de leur mode d'incorporation à l'organisme par remplacement des ions calcium au sein de la matrice minérale de l'os.

Le polonium-210 (demi-vie de 138 jours) est un produit issu de la dégradation du plomb-210 (demi-vie de 22,3 ans). L'élément final de cette chaîne de désintégration radioactive est le plomb-206 qui est un élément stable. De par leurs demi-vies différentes, il existe un équilibre entre le plomb-210 et le polonium-210 dans l'organisme. Cet équilibre est rompu au décès de l'individu (Ziad *et al.* 2012) par arrêt d'apport en plomb-210. C'est donc la mesure de ce déséquilibre qui permet d'estimer un intervalle *post mortem*. Cependant, la quantité absorbée de plomb varie en fonction des habitudes alimentaires (la consommation de fruits de mer et de poissons augmente les quantités absorbées) et du comportement des individus (la consommation de cigarettes augmente aussi son absorption) (Spencer *et al.* 1977). Utiliser le ratio polonium-

²¹⁰Pb/²¹⁰Pb permet donc de pallier ce biais dans les estimations de l'intervalle *post mortem* car il est rare de connaître les habitudes de vie des personnes non identifiées. Cependant le polonium-210 présente moins d'affinité pour la matrice osseuse que le plomb, il est plus mobile et labile, donc sa mesure peut présenter des variations entre les individus d'une même population.

Un problème de cette méthode est son coût relativement important, associé à des variations individuelles dans le métabolisme du plomb et aux effets de la diagenèse. Cette méthode demande aussi beaucoup de temps puisque les mesures durent de 3 à 6 mois pour avoir des résultats précis.

3.2.3. Synthèse sur les méthodes d'estimation de l'intervalle *post mortem* à partir de restes osseux squelettiques

Estimer l'intervalle *post mortem* à partir de restes osseux humains s'avère être une question difficile pour l'anthropologue ou le médecin légiste. En effet, la variabilité dans la décomposition du corps humain étant la règle, il faut toujours garder en tête que plus l'intervalle *post mortem* est grand, et plus la précision de son estimation diminue.

Les méthodes utilisées pour évaluer l'intervalle *post mortem* varient selon leur précision et leur fiabilité, leur coût et leur praticité. De par la nature très variable de la décomposition, il est peu probable qu'un jour soit développée une méthode précise et universelle. Cependant, établir une méthode alliant la recherche et la mesure de plusieurs des indicateurs qui sont avérés corrélés à l'intervalle *post mortem* (fraction organique, fraction minérale, citrate) est envisageable.

3.2.4. Limites des méthodes existantes

Il est crucial que les experts médico-légaux aient les connaissances adéquates pour estimer depuis combien de temps la personne est décédée. La façon la plus commune pour obtenir de telles informations est de réaliser des études contrôlées sur des individus décédés dont on connaît l'âge, l'origine, le sexe, le poids, la cause et la manière du décès. Il faut aussi connaître précisément la date de la mort, la nature du terrain sur lequel est placé le corps, la saison, les températures, les chutes de pluie, l'humidité, l'activité des insectes. Quand tous ces paramètres sont maîtrisés, il reste trois critères permettant l'évaluation d'une méthode d'estimation du délai *post mortem* à partir de reste osseux : elle ne doit pas être affectée par des variables environnementales ; cette technique doit être établie sur des données scientifiques bien établies ; elle doit être relativement peu coûteuse et rapide à mettre en place (Taylor *et al.* 1989).

Face à un squelette ou à des os humains, nous venons de voir qu'il existe beaucoup de méthodes pour estimer l'intervalle *post mortem*. Cependant, la plupart de ces méthodes ne sont que des observations de cas isolés ou d'expérimentations animales ne permettant qu'une extrapolation plus que limitée à l'Homme (Rodriguez et Bass 1985) ou n'autorisant une utilisation que dans un contexte géographique donné. Ces méthodes aideront néanmoins le médecin légiste ou l'anthropologue médico-légal à se faire une idée, afin de pouvoir discriminer des os récents ou modernes d'os archéologiques. Cependant, cette « discrimination », bien que souvent juste, n'est que trop subjective et est conditionnée par de nombreux paramètres liés à l'acte criminel (*e.g.* corps enfoui ou non, carbonisé ou non, démembré) ou à l'environnement (*e.g.* milieu ouvert ou fermé, en plaine ou en montagne, nature du sol, climat, présence d'animaux prédateurs) qui peuvent biaiser l'estimation. En effet, de nombreux cas sont rapportés dans la littérature où des corps peuvent se retrouver à l'état de squelette en quelques mois sous des climats arides (Galloway *et al.* 1989), ou, inversement, rester extrêmement bien conservés pendant plusieurs centaines voire milliers d'années que ce soit par le froid tel Ötzi (Kutschera et Rom 2000) ou par l'ensevelissement dans des tourbières (van der Plicht *et al.* 2004). Ces quelques exemples permettent de montrer que la décomposition n'est pas un phénomène linéaire et prévisible et que, malheureusement, l'expérience de l'expert ne suffit pas.

3.2.5. Nécessité de mettre au point une nouvelle méthode d'estimation de l'intervalle *post mortem*

À ce jour, il existe de nombreuses méthodes en sciences médico-légales pour l'estimation des intervalles *post mortem* courts et en archéologie pour les intervalles *post mortem* très longs. Cependant, il n'y a pas de méthode précise et fiable reconnues par la communauté scientifique pour les intervalles *post mortem* compris entre 2-3 ans et environ 50 ans, or, dans les contextes médico-légaux, c'est justement l'estimation de ces intervalles *post mortem* qui est capitale. À ce manque de méthodes s'ajoute de nouvelles contraintes d'ordre juridique et jurisprudentiel sur la validité des méthodes employées en criminalistique.

3.2.5.1. Jurisprudence actuelle en matière de méthodologie appliquée à la criminalistique

Depuis quelques années, la jurisprudence, notamment aux États-Unis d'Amérique, tend à renforcer la rigueur demandée en sciences médico-légales. Deux principaux arrêts (*Daubert*⁹ et *Kumho*¹⁰) ont remis en cause la validité du témoignage des experts. De telles situations ne se

⁹ Daubert contre Merrel Dow Pharmaceuticals, 1993.

¹⁰ Kumho Tire Co. contre Carmichael, 1999.

sont pas encore produites en France, mais l'impact de ces arrêts sur la communauté scientifique – toutes disciplines confondues – est tel qu'ils ne doivent pas être ignorés (Dirkmaat *et al.* 2008 ; Page *et al.* 2011a, b).

Dans le système judiciaire américain, le rôle du juge est celui de contrôleur (« gatekeeper ») du déroulement du procès. Il s'assure de la validité et de la pertinence des documents et témoignages qui seront présentés aux jurés. En effet, les jurés ne sont pas des spécialistes des différents domaines d'expertise qui seront abordés au cours du procès, il revient donc au juge d'estimer la pertinence d'une expertise avant que l'expert ne témoigne devant la cour. Aux États-Unis, les experts sont choisis par les parties et n'ont aucune obligation d'indépendance ni d'impartialité (leur responsabilité ne peut être remise en cause). Il revient au juge de valider sa qualité de témoin afin qu'il puisse témoigner devant les jurés¹¹. Avant les arrêts *Daubert* et *Kumho*, le juge devait s'assurer que l'expert proposé par les parties possédait les qualifications (diplômes) requises. Cependant, la qualification des experts ne permettait pas pour autant d'attester de la qualité scientifique et objective des témoignages présentés devant les jurés. Depuis l'arrêt *Daubert*, le juge est donc aussi tenu de vérifier que la méthodologie et les théories employées par l'expert pour étayer son argumentation sont validées par la communauté scientifique à laquelle appartient l'expert, en termes de pertinence et de fiabilité.

À la suite de cet arrêt ont donc été établis des standards, dits de *Daubert*, qui permettent de juger de l'admissibilité de la preuve. Les méthodes employées doivent remplir des critères exigeants :

- La méthode doit avoir été testée.
- Elle doit être publiée dans une revue avec comité de lecture.
- Les marges d'erreur potentielles ou connues doivent être données (assorties de probabilités) : le taux d'erreur doit être mesuré.
- La méthode doit être acceptée par la communauté scientifique.

Ces quatre critères ont été assouplis avec l'arrêt *Kumho*, rendu par la Cour suprême américaine, notamment pour les témoignages d'experts non scientifiques. Cependant, les méthodes établies en prenant en compte tous ces critères ne peuvent pas pour autant être automatiquement qualifiées de fiables ; en effet, cela dépend du degré de fiabilité attendue de l'évaluation qui est faite de la méthode (Hesler 2002). Les experts doivent donc s'appuyer sur des méthodes robustes et fiables afin que leurs conclusions ne puissent pas être remises en cause, ou du moins, puissent être le moins critiquées possibles. Dans ce contexte, établir une nouvelle méthode demande l'établissement d'un protocole rigoureux : les hypothèses formulées doivent être validées ou invalidées par l'expérimentation, testées sur des échantillons différents de ceux qui ont servi à la mettre au point et les résultats doivent être publiés et acceptés par la

¹¹ Federal Rules of Evidence, rules 702 (Testimony by Expert Witnesses) and 703 (Bases of an Expert's Opinion Testimony).

communauté scientifique. Cependant, pour les méthodes spécifique à l'Homme – par exemple les méthode de détermination du sexe, d'estimation de l'âge, d'estimation du délai *post mortem*, les méthodes en toxicologie – les expérimentations animales ne suffisent parfois pas et il est nécessaire de réaliser des expérimentations sur l'être humain avec toutes les contraintes supplémentaires que cela implique.

Le retentissement de l'affaire *Daubert* et la mise en place des critères en découlant se sont ressentis en anthropologie médico-légale par la multiplication des publications concernant la validation de méthodes déjà existantes jusqu'alors acceptées par la communauté scientifique. Pour Dirkmaat et collaborateurs (2008), l'arrêt *Daubert* renforce l'idée selon laquelle les anthropologues médico-légaux doivent être des scientifiques en premier lieu, puis ensuite des professionnels.

Les méthodes d'estimation de l'intervalle *post mortem* doivent donc couvrir des périodes relativement longues (entre la période actuelle et 100 ans environ) et présenter des critères de précision et de fiabilité importants assortis d'une marge d'erreur calculée.

3.2.5.2. Prérequis méthodologique et matériel

Les méthodes d'estimation de l'intervalle *post mortem* sont par définition des méthodes quantitatives qui, par l'intermédiaire d'outils mathématiques et statistiques, cherchent à décrire, à prévoir le comportement du tissu osseux à travers le temps.

L'élaboration d'une telle méthode relève d'une démarche inductive qui, à partir de l'observation de cas, permet de développer des hypothèses et des modèles. Afin que cette approche soit la plus exhaustive possible, elle doit répondre à un grand nombre de conditions et de règles incontournables. En effet, selon le paramètre étudié, il faut définir une population de référence pour laquelle nous connaissons ce paramètre (dans notre cas, il s'agit de l'intervalle *post mortem* ou de la date de décès). Cette population initiale doit idéalement être représentative de la population générale et présenter une forte homogénéité. Ensuite, il faut prendre en compte tous les paramètres, toutes les variables qui sont potentiellement corrélés au paramètre étudié. Il est important de connaître le plus possible d'informations afin de limiter les biais d'interprétation des résultats soit par une sur-interprétation, par une interprétation trop simpliste, ou par une mauvaise interprétation des données : on diminue ainsi la subjectivité et on augmente la fiabilité de la méthode.

Lorsque la méthode est établie, on doit vérifier sa fiabilité et sa précision en la testant sur des individus issus de la population initiale – mais non compris dans l'étude – puis sur une population différente de celle qui a servi à la mettre au point. Cette méthode doit aussi être validée par d'autres chercheurs afin de vérifier que son emploi est aisé et qu'il n'entraîne pas une

augmentation trop importante des intervalles de confiance des estimations (bonne reproductibilité de la méthode).

Afin d'établir une méthode d'estimation de l'intervalle *post mortem*, il convient donc de disposer d'échantillons osseux humains à propos desquels nous disposons de beaucoup d'informations. De par la nature des informations nécessaires, le plus souvent l'identité des individus est aussi connue. Une des sources possibles est l'utilisation de corps humain ou de produits issus de celui-ci disponibles pour les projets de recherche. Or, comme nous allons le voir plus loin, toute personne participant à un programme de recherche scientifique doit avoir donné son consentement (avant l'utilisation de résidus opératoires ou avant d'avoir fait don de son corps à la science) et doit avoir été informée de la finalité des recherches. Ceci nécessite la réalisation d'un protocole de recherche détaillé et les résultats de la recherche ne peuvent être que prospectifs. De ce fait, la réalisation de telles recherches doit s'envisager sur plusieurs années, de l'établissement et la validation du protocole, à la collecte des échantillons, leur analyse, le traitement des données et leur interprétation, et la validation des résultats. De plus, il existe des biais importants dans de telles recherches car la population étudiée ne sera pas représentative de la population générale, et ceci pour plusieurs raisons :

- Les personnes faisant don de leurs corps sont le plus souvent âgées, la population recueillie ne présente donc pas une composition démographique comparable à la population générale.
- Les personnes faisant don de leurs corps sont amenées directement après leur décès au centre de dons des corps. Leur corps n'est donc pas altéré par les processus taphonomiques (*e.g.* décomposition, enfouissement) que l'on pourrait retrouver en contextes médico-légaux.
- Les résidus opératoires correspondant à des fragments osseux sont des pièces anatomiques pathologiques, elles peuvent donc être affectées, par exemple, par l'ostéoporose, par la pose de prothèses de hanche, par des maladies infectieuses (amputation).

Les méthodes établies à partir de ces populations et matériels ne seront donc pas universelles et elles seront difficilement applicables dans d'autres contextes.

Afin d'augmenter la taille des échantillons servant à l'établissement des méthodes, il faut donc avoir recours à d'autres corps que ceux donnés à la science et aux pièces opératoires, tout en connaissant le maximum d'informations sur les individus. Les données obtenues seront donc le plus souvent parcellaires et nécessiteront un traitement statistique plus poussé afin d'extraire l'information recherchée (intervalle *post mortem*) de la multitude de paramètres connexes précédemment énoncés.

La législation française est telle que de nombreux paramètres notamment liés à la taphonomie ne pourront pas être testés. En effet, nous ne disposons pas de complexes comme ceux existant aux États-Unis d'Amérique (*e.g.* « fermes des corps » des université du Tennessee,

de Caroline ou du Texas) qui permettent l'étude de la décomposition des corps humains dans différentes conditions. L'acquisition de telles données en France ne peut se faire que par l'accumulation d'informations issues de cas réels et par la systématisation d'observations.

Afin de mettre au point une telle méthode, il convient donc de connaître beaucoup d'informations sur le matériel utilisé que ce soient des données propres à l'individu (comme la date de naissance, le sexe, le poids, la taille, la présence de pathologies et/ou de traitements, le type d'os analysé), ou des données relatives au décès (comme la date de décès, la cause de la mort, les circonstances entourant la mort), ou encore des données concernant la conservation du corps (comme le milieu de conservation, la nature du sol, les conditions climatiques, la présence d'animaux prédateurs). L'observation et l'étude de tous ces paramètres ne sont pas forcément suffisantes pour mettre au point une telle méthode car les paramètres sélectionnés ne représentent que les variables que nous supposons pertinentes.

Le but de notre travail est donc de mettre en corrélation les indicateurs connus de la dégradation du tissu osseux qui sont liés au délai *post mortem* grâce à une technique qui jusqu'ici a été très peu utilisée pour l'étude du tissu osseux, il s'agit de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire dont nous détaillerons le principe dans la troisième partie. Avant d'aborder cet aspect technique de notre travail, nous allons détailler le volet juridique de toute étude sur du matériel osseux récent, qu'il soit d'intérêt médico-légal ou non, mais ne possédant pas le statut particulier de matériel archéologique.

DEUXIEME PARTIE

Le statut juridique du corps humain dans la
recherche scientifique en France

Aborder la question du statut juridique du corps humain dans la recherche scientifique en France n'est pas chose facile. Une des principales difficultés rencontrées provient du manque de définition précise des termes les plus souvent employés – par exemple le corps humain, les prélèvements, les consentements – qui conduisent le porteur du projet de recherche à une interprétation parfois subjective des textes législatifs en fonction de ses propres intérêts. Il apparaît donc que la recherche scientifique sur le corps humain n'est pas exclue même si, en pratique, il est très rare qu'elle soit menée pour des problématiques autres que médicales et thérapeutiques. Dans ce contexte, il est légitime de se poser la question de l'utilisation du corps humain, des éléments ou produits issus de celui-ci, dans des problématiques médico-légales telle la mise au point d'une méthode d'estimation du délai *post mortem*.

1. DEFINITIONS JURIDIQUES

Nous allons tenter de définir les différents termes les plus couramment rencontrés dans le cadre de la recherche scientifique à partir de matériel biologique.

1.1. LE CORPS HUMAIN, SES ELEMENTS ET SES PRODUITS

Il est très difficile de parler de la définition du corps humain sans parler de la définition de la personne et de la chose. Comme l'a dit justement Arnoux (Arnoux 2003), « *la personne est en droit un être humain et tout être humain est une personne. Telle est la réalité juridique actuelle* ».

Jusqu'aux lois de bioéthique¹², il n'y avait pas de distinction de statut entre le corps humain et la personne (exception faite des cadavres), les droits reconnus à la personne concernaient donc aussi le corps. Actuellement, le corps possède son propre statut, les éléments qui le constituent en sont une composante tant qu'ils lui sont rattachés. Le statut du corps humain est détaillé en partie dans le Code civil¹³ (2012). Il est ainsi régi par différents principes qui ne cessent pas avec la mort de l'individu : primauté de la personne, respect de sa dignité, respect de l'intégrité du corps humain (inviolabilité), non patrimonialité du corps humain et de ses éléments et produits. Devant tous ces droits, l'utilisation du corps humain dans un cadre de recherche scientifique

¹² Loi n°94-653 du 29 juillet 1994 relative au respect du corps humain ; Loi n°94-654 du 29 juillet 1994 relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal ; Loi n°2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique.

¹³ C. civ., articles 16-1 à 16-9.

semble donc compromise ; cependant, le Code de la santé publique¹⁴ (2012) rend possible le don et l'utilisation des éléments et produits du corps humain sous certaines conditions.

Une fois séparés du corps humain, les éléments changent de statut et deviennent des choses. Le principe de non patrimonialité du corps humain implique alors que les éléments issus de ce corps n'appartiennent à personne, ni à la personne sur laquelle ils ont été prélevés, ni à celle qui a réalisé le prélèvement. Dans tous les cas, le corps humain ou les parties du corps humain ne peuvent être vendus ou achetés¹⁵.

Nous venons de voir que le statut du corps humain est pris en compte dans la législation française sans qu'aucune réelle définition n'en soit donnée que ce soit au niveau du corps en lui-même ou des éléments qui le composent (organes, tissus). Les définitions les plus communément admises par la communauté médicale sont celles proposées par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) pour laquelle un organe est « *un élément anatomique distinct constitué de cellules et tissus concourant à la réalisation d'une fonction physiologique particulière* » (e.g. cœur, reins, pancréas, foie, poumons, intestin) et un tissu est « *un groupe de cellules de structure similaire spécialisées dans une même fonction* » (e.g. cornées, os, éléments de l'appareil locomoteur, valves cardiaques). Les différents tissus s'organisent entre eux pour former un organe. La législation ne donne donc aucune définition mais un arrêté du Ministère du travail et des affaires sociales¹⁶ dresse plutôt une liste des éléments prélevés sur le corps humain qui en font partie (e.g. cornée, os, éléments de l'appareil locomoteur, les valves cardiaques). Nous retrouvons ici les mêmes éléments que ceux répertoriés par la communauté médicale. Cependant, il est à noter que, dans cet arrêté, il n'est aucunement fait mention de l'utilisation de ces prélèvements à des fins autres que thérapeutiques. Qu'en est-il de l'utilisation à des fins scientifiques ?

Quelle que soit l'utilisation qui sera faite du corps ou des éléments et produits issus de celui-ci, toute action nécessite l'obtention du consentement de la personne.

1.2. LES DIFFERENTS CONSENTEMENTS

Le droit français reconnaît que les personnes peuvent disposer librement de leurs corps, sur lequel elles ont des droits. Cette libre disposition, en tant que concept juridique, justifie la nécessité absolue d'obtention du consentement de la personne de son vivant avant tout usage de son corps (don d'organe) voire de son cadavre (don d'organe et don du corps à la science)

¹⁴ C. santé publ., article L1211-1.

¹⁵ C. civ., article 16-5 ; Avis n°21 du 13/12/1990 du Comité Consultatif National d'Éthique (CCNE) pour les sciences de la vie et de la santé.

¹⁶ Arrêté du 1^{er} avril 1997 du Ministère du travail et des affaires sociales portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives au prélèvement des tissus et au recueil des résidus opératoires issus du corps humain utilisés à des fins thérapeutiques (Journal Officiel du 06/04/1997).

(Rimbault 2005). Selon la finalité de l'usage du corps et des éléments et produits issus de celui-ci, différents consentements doivent être obtenus. Il n'existe donc pas qu'une seule définition ; on distingue ainsi :

- Le **consentement exigé** : les intérêts individuels priment sur l'intérêt collectif.

Cela concerne, par exemple, la liberté des funérailles¹⁷ ou la liberté de faire don de son corps¹⁸.

- La **présomption de consentement** : représenté par l'adage « *qui ne dit mot consent* ».

La loi dite Caillavet¹⁹ autorise les prélèvements effectués à des fins thérapeutiques ou scientifiques sur tout individu n'ayant pas fait mention expresse de son refus. Dans ce cas de figure, les intérêts collectifs priment sur ceux de l'individu. Cette loi a été fortement critiquée, car, d'une part, elle élargissait les prélèvements à une utilisation scientifique et, d'autre part, elle n'accordait aucun droit d'opposition à la famille du défunt. Au fil des textes législatifs²⁰ sont apparues des limitations sur les indications scientifiques de tels prélèvements et sur le droit des familles et des proches à faire part de leur refus même si le consentement présumé reste la règle.

- Le **consentement nié** : la volonté et le consentement individuels ne sont pas pris en compte pour des raisons de préservation de l'ordre public ou de l'ordre moral.

Nous pouvons prendre comme exemple la volonté de certaines personnes d'être cryogénisées après leur décès. Ces personnes se voient opposer un refus pour des motifs de respect d'objectifs d'hygiène et de santé publique²¹. De plus, la cryogénisation ne constitue pas un mode d'inhumation prévu par le Code général des collectivités territoriales (2012). De même, d'après le Code de procédure pénale (2012), si une autopsie d'un cadavre est indiquée pour recherche des causes de la mort²², il ne peut pas y avoir d'opposition que ce soit de la part du défunt avant son décès ou de sa famille. Pareillement, sous certaines conditions²³, les exhumations peuvent être autorisées et elles ne sont alors pas assimilées à des profanations de sépultures.

- Le **consentement impossible** : la volonté et le consentement individuels sont ignorés par la collectivité afin de protéger l'individu contre lui-même, le plus souvent dans le respect du principe de la dignité de la personne humaine.

Le prélèvement des éléments et produits issus du corps humains est alors envisageable et doit alors faire l'objet d'un consentement préalable du donneur, lequel peut être révoqué à tout

¹⁷ C. civ., article 16-5 ; Avis n°21 du 13/12/1990 du CCNE pour les sciences de la vie et de la santé.

¹⁸ CGCT, article R2213-13.

¹⁹ Loi n°76-1181 du 22 décembre 1976 relative aux prélèvements d'organe, article 2.

²⁰ Loi n°94-654 du 29 juillet 1994 relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal (abroge la loi Cavaillet) ; Loi n°2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique.

²¹ Décision judiciaire du Conseil d'État, 6 janvier 2006 (cas Conseil d'État, 5^{ème} et 4^{ème} sous-sections réunies, du 6 janvier 2006, 260307).

²² C. pr. pén., article 74.

²³ CGCT, articles R2213-40, R2213-41 et R2213-42.

moment. La finalité de l'utilisation de ces éléments doit être signifiée au donneur. Cependant, une utilisation différente de ces éléments peut néanmoins être envisagée si la personne est informée et ne manifeste pas son opposition. Si la personne concernée ne peut être retrouvée, ou si un des comités consultatifs de protection des personnes juge que l'obtention de son consentement n'est pas nécessaire, les éléments prélevés peuvent être utilisés directement (Callies *et al.* 2004). Cependant, cette dérogation d'information d'utilisation des prélèvements ne peut être invoquée si la personne est décédée.

1.3. LA MORT

D'après le dictionnaire médical, la mort est « *un arrêt complet et définitif des fonctions d'un organisme vivant, avec disparition de sa cohérence fonctionnelle et notamment de l'activité électrique du cerveau (tracé électroencéphalographique plat), et destruction progressive de ses unités tissulaires et cellulaires* » (Manuila *et al.* 1996). En droit français, il n'existe pas de définition légale de la mort mais le Code de la santé publique²⁴ donne les critères à valider afin de constater :

- La **mort « cardiaque »** : absence totale de conscience et d'activité motrice spontanée, abolition de tous les réflexes du tronc cérébral et absence totale de ventilation spontanée.
- La **mort « cérébrale »** : destruction encéphalique ayant un caractère irréversible mis en évidence par la réalisation de deux encéphalogrammes nuls et aréactifs ou d'une angiographie objectivant un arrêt de la circulation encéphalique.

Ces deux définitions permettent de prendre en compte les morts dues à un arrêt cardiaque et celles dues à un état de mort cérébrale, distinction qui a longtemps fait l'objet de controverses. La constatation du décès doit faire l'objet d'un « *procès-verbal de constat de la mort* » établi par le ou les médecins qui l'ont constatée²⁵. Une autre définition très fréquemment employée est celle publiée dans le Journal Officiel du Sénat²⁶ : « *l'état de mort [est diagnostiqué] sur la base d'un ensemble concordant de signes négatifs coïncidant avec l'arrêt des fonctions vitales (respiration, rythme cardiaque, circulation sanguine, activité cérébrale, réflexes oculaires et ostéotendineux) et de signes positifs d'apparition de l'état cadavérique (mydriase, hypothermie, hypotonie ou rigidité cadavérique, lividités)* ». Il apparaît de ces deux dernières définitions que la mort demeure encore une notion difficile à préciser notamment dans les instants immédiats suivant le décès. Ceci peut s'expliquer par le fait que la mort est un phénomène dynamique et non instantané, le passage de la vie à la mort représentant un état éphémère non défini par le droit français.

²⁴ C. santé publ., articles R1232-1 et R1232-2.

²⁵ C. santé publ., articles R1232-3 et R1232-4.

²⁶ Journal Officiel Sénat du 15/02/1990, page 324, réponse du ministère de la solidarité à la question écrite n°06995 de M. Pierre-Christian Taittinger.

1.4. LE CADAVRE

Étymologiquement, le mot cadavre provient du latin *cadaver* qui désigne le corps d'un homme mort. Il s'agit donc du corps d'un homme qui a cessé de vivre.

Juridiquement, le cadavre n'est pas défini mais il est mentionné à de nombreuses reprises dans les différents codes en vigueur. L'utilisation du terme « *cadavre* » se fait alors en sous-entendant qu'il s'agit d'un corps ayant conservé une certaine intégrité physique (préservation de tissus mous) permettant entre autres des actes tels l'embaumement²⁷, le prélèvement d'échantillons biologiques²⁸, la prise d'empreintes digitales ou génétiques²⁸, la description physique²⁹, l'autopsie²⁹, la réalisation de soins de conservation consécutive au décès³⁰. Le Code pénal (2012) prévoit que toute atteinte à cette intégrité est punie par la loi^{31, 32}. Le cadavre n'est donc pas – ou plutôt n'est plus – une personne, ce qui autorise son utilisation (don d'organes, don de corps à la science), mais s'apparente à une « chose » de nature humaine n'ayant pas de valeur marchande (Claire 2011).

Il reste la question du statut du corps une fois la décomposition des tissus mous achevée : la législation s'appliquant à un cadavre s'applique-t-elle à un squelette ? Par exemple, dans le cadre de découverte de cadavre³³, la recherche des causes de la mort – afin de déterminer si celle-ci résulte d'une infraction ou non – se fait lorsque les causes sont suspectes ou inconnues, mais de ce fait, elle ne se fait pas systématiquement pour toute découverte de cadavre. Dans ces conditions, la découverte de squelette ou d'os humains peut ne pas relever de ce cadre législatif.

1.5. LES PRELEVEMENTS

Les cadavres peuvent faire l'objet de prélèvements que ce soit au niveau des organes ou des tissus tels que définis précédemment. Ces prélèvements biologiques sont réalisés dans trois buts principaux :

- À des **fins thérapeutiques** ³⁴ : greffe d'organes, utilisation des tissus.
- À des **fins scientifiques** : l'arrêté du 1^{er} avril 1997³⁴ concerne les prélèvements de tissus et la collecte de résidus opératoires utilisés à des fins thérapeutiques, il n'est pas fait mention de l'utilisation de ces éléments à des fins scientifiques.

²⁷ C. santé publ., article R5132-61.

²⁸ C. pr. pén., articles R53-10 et R53-14-1.

²⁹ C. pr. pén., articles R117 et R120.

³⁰ CGCT, articles R2213-5 et R2213-6.

³¹ C. pén., article 225-17.

³² Henry Michel « Quatre hommes sont jugés à partir d'aujourd'hui pour violation de sépultures Carpentras, le récit de sept ans d'enquête », 17 mars 1997, www.liberation.fr (page consultée le 29/10/2013).

³³ C. pr. pén., article 74.

³⁴ Arrêté du 1^{er} avril 1997 du Ministère du travail et des affaires sociales portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives au prélèvement des tissus et au recueil des résidus opératoires issus du corps humain utilisés à des fins thérapeutiques (Journal Officiel du 06/04/1997).

- Dans la **recherche des causes de la mort** : l'autopsie réalisée dans ce cadre est prioritaire sur tout autre acte ou décision.

Il est important de noter que l'inscription sur le registre national automatisé des refus de prélèvement n'empêche pas la réalisation « *d'expertises, constatations et examens techniques ou scientifiques éventuellement diligentés dans le cadre d'une enquête judiciaire ou d'une mesure d'instruction* »³⁵. Les prélèvements réalisés au cours de l'autopsie deviennent alors des scellés biologiques judiciaires dont le conditionnement nécessite le scellement par un cachet de cire réalisé par un officier de police judiciaire. Il est fait mention de ces scellés dans le procès verbal d'assistance à autopsie.

1.6. LES SCELLES BIOLOGIQUES

Les prélèvements réalisés sur le cadavre, voire potentiellement le cadavre en lui-même, prennent le statut juridique d'indices. Ces prélèvements sont ensuite placés sous scellés. La décision de réaliser des prélèvements (biologiques ou non) revient à l'officier de police judiciaire, donc la nature de ces prélèvements peut être très variable. La nature des scellés biologiques fait qu'ils sont le plus souvent conservés au sein des instituts médico-légaux plutôt que dans les tribunaux³⁶ et leur destruction ne peut se faire qu'avec l'autorisation des magistrats. La jurisprudence³⁷ montre que ces éléments ne peuvent pas être rendus à la famille. Malgré l'existence d'un statut pour les prélèvements biologiques, il est fait état dans le rapport de la Mission interministérielle en vue d'une réforme de la médecine légale que certains de ces prélèvements, effectués à titre conservatoire, sont conservés par les instituts médico-légaux sans être placés sous scellés. Il en découle qu'aucune demande de destruction ne peut être ordonnée par l'autorité judiciaire.

1.7. LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Dans le droit français, malgré l'existence d'un Code de la recherche (2011) et la présence de nombreuses mentions à la recherche scientifique, aux examens et analyses réalisés à des fins scientifiques, il n'y en a pas de réelle définition juridique. Cependant, « *la recherche scientifique et le développement technologique sont [reconnus comme] des priorités nationales* »³⁸.

³⁵ C. santé publ., article R1232-6.

³⁶ Rapport de la mission interministérielle en vue d'une réforme de la médecine légale, ministère de la Justice, ministère de la Santé et des Solidarités, IGAS/IGSJ, janvier 2006, page 65.

³⁷ Crim., 3 avril 2008, pourvoi n°01-81.592, *Bull. crim.* 2008, n°75.

³⁸ Code de la recherche, article L113-1.

Une des définitions qui apparaît la plus appropriée et la plus usitée est celle donnée par Legendre (1993) qui définit la recherche scientifique comme « *un ensemble d'activités méthodiques, objectives, rigoureuses et vérifiables dont le but est de découvrir la logique, la dynamique ou la cohérence dans un ensemble apparemment aléatoire ou chaotique de données, en vue d'apporter une réponse inédite ou explicite à un problème bien circonscrit ou de contribuer au développement d'un domaine de connaissances* ». Autrement dit, la recherche scientifique est un processus permettant, à partir d'une question posée dans un contexte donné (problématique), de formuler des hypothèses, de les tester grâce à des observations ou des expérimentations afin d'obtenir des résultats qui seront analysés et interprétés.

Le Code de la recherche³⁹ définit les objectifs de la recherche publique, à savoir :

- Le **développement** et le **progrès** de la recherche dans tous les domaines de la connaissance ;
- La **valorisation** des résultats de la recherche ;
- Le **partage** et la **diffusion** des connaissances scientifiques ;
- Le développement d'une **capacité d'expertise** ;
- La **formation** à la recherche et par la recherche.

Contrairement à la recherche scientifique, la recherche biomédicale est définie par le droit français⁴⁰ comme « *les recherches organisées et pratiquées sur l'être humain en vue du développement des connaissances biologiques ou médicales* ». Cependant, on peut se demander dans quelle mesure la recherche biomédicale n'est-elle pas une branche de la recherche scientifique ? N'est-elle pas régie par les mêmes objectifs ? Si, bien sûr.

1.8. DEONTOLOGIE ET ETHIQUE

Toute recherche scientifique, ayant un objectif médical ou non, réalisée sur le corps humain ou à partir des produits et éléments issus de celui-ci, ne peut se faire sans respecter les principes déontologiques et éthiques. Ces termes, associés le plus souvent à la notion de bioéthique, sont très souvent employés dans les protocoles de recherche ou dans les formulaires d'information aux patients mais sans être réellement définis clairement. Selon le Larousse⁴¹, l'éthique se définit comme « *l'ensemble des principes moraux qui sont à la base de la conduite de quelqu'un* » et la déontologie comme « *l'ensemble des règles et des devoirs qui régissent une profession, la conduite de ceux qui l'exercent* ». La distinction entre ces deux notions est parfois floue et il n'existe pas de consensus à son sujet. Certains auteurs ont donc décidé de les employer indifféremment (Vergès 2009).

³⁹ Code de la recherche, article L112-1.

⁴⁰ C. santé publ., article L1121-1.

⁴¹ <http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais-monolingue>.

L'éthique médicale relève des règles de bonnes conduites médicales générales et notamment de la conduite des professionnels de santé entre eux et vis-à-vis de leurs patients. Ces règles font partie intégrante du code de déontologie. Le terme « *bioéthique* » est employé pour la première fois en France dans le texte de loi s'y rapportant⁴², ces lois de bioéthique régissant les relations entre le droit, la science et l'utilisation du corps humain et de ses éléments et produits. Cependant, l'éthique médicale ou bioéthique sont à différencier de l'éthique scientifique ou éthique de la recherche.

L'éthique dans la recherche⁴³ reprend les dispositions fixées par le Code de la santé publique⁴⁴ qui fixent la composition et le fonctionnement du Comité Consultatif National d'Éthique (CCNE), lequel a pour mission d'« *éclairer les progrès de la science, soulever des enjeux de sociétés nouveaux et poser un regard d'éthique sur ces évolutions* » avec comme objectif de « *faire participer les citoyens à la réflexion éthique et leur permettre de comprendre les enjeux éthiques que soulèvent certaines avancées scientifiques dans le domaine des sciences de la vie et de la santé* »⁴⁵. Cependant, le CCNE ne fait qu'émettre des avis sur des questions qui lui sont explicitement posées.

Par ailleurs, dans le Code de la recherche, il n'est pas fait mention des principes qui gouvernent l'intégrité scientifique du chercheur. Le code ne fait état que des principes de l'activité scientifique en général – publications, valorisations de la recherche, recrutement et évaluation des chercheurs.

2. QUELS MATERIELS UTILISER ?

2.1. RESPECT DES PRINCIPES DEONTOLOGIQUES ET ETHIQUES

Face au manque législatif concernant les principes déontologiques et éthiques se développent des normes, les normes se définissant comme des « *documents de références élaborés de manière consensuelle par toutes les parties intéressées, portant sur des règles, des caractéristiques, des recommandations ou des exemples de bonnes pratiques, relatives à des produits, à des services, à des méthodes, à des processus ou à des organisations* »⁴⁵. Ce système normatif est plus adapté à la communauté scientifique, car le système est plus souple et s'adapte au cas par cas. Cependant, les projets de recherche utilisant le corps humain ou ses éléments et produits doivent être socialement acceptables c'est-à-dire que toutes les expérimentations ne peuvent pas être conduites au nom de la recherche. Les normes doivent garantir le respect de l'intégrité physique (que ce soit de l'être humain ou de l'animal) et la limitation de la souffrance.

⁴² Loi n°2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique.

⁴³ Code de la recherche, article L211-1.

⁴⁴ C. santé publ., articles L1412-1 à L1412-6.

⁴⁵ Décret n°2009-697 du 16 juin 2009 relatif à la normalisation, article 1.

Il existe cependant une grande hétérogénéité des normes qui s'explique par la diversité des institutions qui les fixent, et par la diversité des projets de recherche et des disciplines concernés (Vergès 2009). Concernant la recherche sur le corps humain et ses éléments et produits, ces normes sont très souvent contraignantes et limitatives en termes de projets de recherche. En effet, il est parfois plus simple et plus rapide de monter des projets de recherche avec des institutions étrangères qui n'appliquent pas les mêmes normes et procédures (*e.g.* les « fermes des corps » américaines).

On est donc face à une dualité de position :

- D'une part, l'assouplissement de certains cadres normatifs au nom de la **liberté de la recherche** demandé par de nombreux chercheurs devant la lourdeur et la lenteur administratives des protocoles à mettre en place ;
- Et d'autre part, de donner un cadre encore plus strict afin de diminuer des éventuels risques pour la santé ou l'environnement, au nom du **principe de précaution** (Plaud 2010).

L'utilisation d'échantillons tels le corps humain ou ses éléments et ses produits dans les protocoles de recherche n'est donc pas si facile à mettre en place. Nous allons voir quelles sont les solutions qui s'offrent à nous afin de nous procurer un tel matériel et quels sont les textes en vigueur qui les régissent.

2.2. CENTRE DE DON DES CORPS

Souvent confondus, le don d'organes et le don de corps à la science ont pourtant des finalités différentes :

- Le **don d'organe** est réalisé dans un but thérapeutique, le prélèvement de l'organe se fait chirurgicalement sur un donneur (vivant ou décédé), puis il est transplanté chez un receveur ;
- Le **don de corps** permet de faire progresser la médecine, par l'enseignement de l'anatomie par exemple, ou de faire avancer la recherche médicale. En pratique, il s'agit essentiellement de l'utilisation des corps en vue de former les médecins.

Il existe aussi des différences quant à législation qui les gouverne :

- Le **don d'organe** repose sur la présomption de consentement c'est-à-dire que les personnes qui n'ont pas fait état de leur volonté de refus de prélèvement en s'inscrivant sur le registre national des refus sont techniquement des donneurs d'organes potentiels⁴⁶. Dans la réalité, les médecins préleveurs sont tenus de vérifier auprès de la famille ou des

⁴⁶ C. santé publ., article L1232-1.

proches de la personne décédée si celle-ci avait exprimé une quelconque volonté à ce sujet.

- Le **don de corps** nécessite l'expression d'un consentement exigé⁴⁷ avec l'établissement d'un document réalisé du vivant de la personne attestant de la volonté de donner. La famille ne peut théoriquement pas s'y opposer⁴⁸.

Toute personne ayant fait don de son corps à la science doit avoir rédigé une déclaration datée et signée de sa main. Il lui est alors remis une carte de donateur qu'il doit conserver sur lui. La remise du corps à l'établissement de santé destinataire ne peut avoir lieu que si la déclaration de décès ne comporte pas d'obstacle médico-légal et doit se faire dans les 48 heures suivant le décès. Il revient alors à l'établissement d'assurer les frais d'inhumation ou de crémation du corps⁴⁹. La singularité de la notion de don de corps à la science fournit une relative liberté quant à l'utilisation qui sera faite du corps que ce soit à des fins de recherche ou d'enseignement. En effet, il n'est pas nécessaire de faire état au préalable de la finalité de l'utilisation du corps ou de ses éléments ou de ses produits et la famille n'a pas non plus à être informée de ce qui a été fait. En fin de processus, le corps n'a d'ailleurs pas à être rendu à la famille : il s'agit donc d'un don global et durable.

En France, on dénombre 28 centres de dons du corps qui recueillent annuellement environ 2500 corps (Werbrouck *et al.* 2008). La législation⁴⁹ ne fait pas mention de l'utilisation qui sera faite du corps à la suite du don, il est juste fait mention du don à « *un établissement de santé, de formation ou de recherche* ». Ces corps peuvent donc théoriquement être utilisés pour tout type de **recherche médicale** mais l'expérimentation ne peut être envisagée puisque le corps doit rester au sein de l'établissement qui a reçu la donation. Tous les centres de dons de corps possèdent des modalités de fonctionnement relativement communes issues de l'application de la législation⁴⁹. Cependant il existe quand même une grande variabilité dans la pratique : certains centres réalisent des questionnaires qui sont remis au médecin traitant pour connaître les antécédents médicaux de la personne ; il peut être fait mention dans le formulaire de don d'une possible utilisation secondaire du corps « *complètement ou partiellement conservé [...] à des fins scientifiques ou pédagogiques* » (Centre de don de corps de Tours par exemple, formulaire fourni en Annexe 2). Il faut cependant insister sur le fait que le plus souvent, la finalité d'utilisation des corps à la science est l'enseignement de l'anatomie que ce soit pour les filières médicales (médecine et odontologie) ou paramédicales (kinésithérapie, podologie). En effet, il s'agit d'un don de corps pour la science sous-entendue médicale comme le mentionne les brochures et formulaires des centres de don des corps (Annexes 2 et 3).

⁴⁷ CGCT, article R2213-13.

⁴⁸ C. pén., article 433-21-1 : « toute personne s'opposant aux funérailles voulues par le défunt peut être punie d'une peine d'emprisonnement et d'amende ».

⁴⁹ CGCT, article R2213-13.

En France, seuls les corps issus du don de corps à la science peuvent être considérés comme des objets scientifiques. Les autres vestiges humains ne sont alors pas soumis à la même législation et il existe donc un flou juridique quant à leur statut et à leur utilisation. Par exemple, si le corps d'une personne décédée est retrouvé et a pu être identifié, un acte de décès doit être établi quel que soit le temps écoulé entre le décès et la découverte du corps⁵⁰. Cependant, lorsqu'un corps ou un squelette est découvert, si le délai de prescription pénale est dépassé⁵¹, le plus souvent aucune investigation supplémentaire ne sera envisagée dans le seul but d'identifier la victime.

2.3. CORPS CONSERVES DANS LES INSTITUTS MEDICO-LEGAUX

Chaque année, en France, des milliers d'autopsies sont réalisées dans les instituts de médecine légale. En 2004, ce ne sont pas moins de 8000 à 8500 autopsies qui ont été effectuées⁵². L'indication d'un tel acte est fournie par les circonstances du décès de la personne (mort violente⁵³, inattendue ou suspecte⁵⁴) qui doivent entraîner le médecin constatant le décès à mentionner l'existence d'un obstacle médico-légal à l'inhumation. Des recommandations européennes⁵⁵ élargissent les indications de réalisation des autopsies aux : « *homicide ou suspicion d'homicide ; mort subite inattendue y compris la mort subite du nourrisson ; violation des droits de l'homme, telle que suspicion de torture ou de toute autre forme de mauvais traitements ; suicide ou suspicion de suicide ; suspicion de faute médicale ; accident de transport, de travail ou domestique ; maladie professionnelle ; catastrophe naturelle ou technologique ; décès en détention ou associé à des actions de police ou militaires ; corps non identifié ou restes squelettiques* ».

L'autopsie des corps ou restes humains non identifiés se fait alors dans deux buts principaux : d'une part, établir les causes du décès et, pour les restes fragmentaires, établir les mécanismes à l'origine de l'état de conservation observé du cadavre ; et, d'autre part, identifier le cadavre. Restituer une identité à la personne décédée, grâce à l'odontologie ou à l'anthropologie médico-légale, participe ainsi au respect du cadavre tel énoncé dans le Code civil (Duguet 2010).

Les corps non identifiés ne constituent qu'une faible partie de toutes les autopsies réalisées annuellement. Le plus souvent, les investigations judiciaires et médico-légales permettent

⁵⁰ C. civ., article 87.

⁵¹ C. pr. pén., article 7 ; C. pén., article 213-5.

⁵² Rapport de la mission interministérielle en vue d'une réforme de la médecine légale, ministère de la Justice, ministère de la Santé et des Solidarités, IGAS/IGSJ, janvier 2006, page 20.

⁵³ C. civ., article 81.

⁵⁴ C. pr. pén., article 74.

⁵⁵ Recommandation N°R(99) 3 relative à l'harmonisation des règles en matière d'autopsie médico-légale, Conseil de l'Europe, Comité directeur pour la bioéthique (CDBI), 2 février 1999.

l'identification, cependant, pour certains corps, aucune identité ne peut être donnée et le corps est conservé à l'institut médico-légal jusqu'à la fin des investigations. Ces corps non identifiés ainsi que les corps non réclamés par les familles (comme les sans domicile fixe, les indigents, les personnes n'ayant pas les moyens de se payer une sépulture), doivent être inhumés, au sein des cimetières de chaque commune où a eu lieu le décès, dans des parcelles réservées appelées depuis 1991 « *division à caveaux de terrain commun* » mais plus connue sous le nom de « *fosse commune* » ou « *carré des indigents* ». L'inhumation est gratuite, prise en charge par la commune et la concession se fait pour une durée de 5 ans. Passé ce délai, si aucun membre de la famille ne s'est manifesté pour réclamer le corps, les corps sont exhumés et incinérés.

L'accès à ces corps médico-légaux, dans un objectif purement de recherche scientifique, permettrait l'obtention de matériel « authentique » en termes de condition de conservation, de variation du délai *post mortem*, de présence de blessures à même de permettre la réalisation d'études, d'observations et de conclusions que n'autorisent pas l'expérimentation animale ou l'extrapolation à partir de matériel humain différent. Cependant, même si ces personnes avaient donné leur consentement à un don de corps à la science, ces corps ne peuvent pas être utilisés, car soit il ne nous est pas possible de vérifier le consentement du défunt car son identité est inconnue, soit, l'identité est connue, mais le délai maximum de 48 heures entre la date de décès et le don est dépassé.

2.4. LES COLLECTIONS DE REFERENCE

En anthropologie biologique « conventionnelle », qui s'attache à l'étude des populations du passé, les collections de références pouvant être utilisées pour tout processus méthodologique peuvent appartenir à deux groupes distincts : d'une part, les collections de sujets parfaitement identifiés, représentatifs d'une population homogène et naturelle (contexte géographique, culturel et chronologique) ; et, d'autre part, des collections plus nombreuses mais limitées en termes de contexte géographique, chronologique et culturel, qui ne suffisent pas à prendre en compte la variabilité globale d'un espace géographique ou chronologique plus vaste. Sur le plan international, il existe donc de nombreuses collections de références⁵⁶, représentant différentes zones géographiques, différentes périodes chronologiques et différents effectifs. Selon les collections, diverses informations sont disponibles (*e.g.* âge, sexe, origines ethniques, cause de la mort, pathologies) et permettent donc de répondre à différentes problématiques méthodologiques. Cependant, ce sont le plus souvent des individus issus de désaffectation de cimetières, de nécropoles, ou de sites archéologiques.

⁵⁶ <http://skeletal.highfantastical.com/>

Concernant notre problématique d'estimation du délai *post mortem*, ces collections ne fournissent pas toutes les caractéristiques nécessaires à la mise au point d'une méthode.

En France, il n'existe pas de collection de référence moderne possédant les caractéristiques requises. La constitution d'une telle collection devrait répondre à différents textes législatifs relatifs :

- Au respect dû aux morts et notamment de l'interdiction de la violation ou de la profanation de sépultures⁵⁷. Il n'est nullement fait mention du statut des archéologues et anthropologues lors des fouilles de sépultures et nécropoles en contexte archéologique.
- Au respect du corps humain⁵⁸.
- Aux principes des fouilles archéologiques : les restes humains sont assimilés à des écofacts c'est-à-dire des « *matériaux naturels ou de nature biologique recueillis lors de l'opération [de fouilles archéologiques] ... [Ils] désignent les matériaux issus du règne animal [...]* »⁵⁹.

Si une telle entreprise était menée, les contraintes administratives et législatives liées à la recherche sur des corps humains rendraient le temps de collecte très long. La finalité de la collecte doit donc tendre vers un recrutement le plus homogène possible, et pour chaque échantillon collecté, les limites de sa représentativité doivent être prises en compte. La multitude de paramètres non comparables entre échantillons doit être analysée dans le but d'extraire l'information recherchée de toutes les autres informations recueillies.

2.5. LES DECHETS D'ACTIVITE DE SOINS

Les résidus opératoires « *désignent les tissus, cellules et produits humains recueillis à l'occasion d'une intervention médicale lorsqu'ils sont conservés en vue d'une utilisation ultérieure* »⁶⁰ c'est-à-dire « *à des fins thérapeutiques ou scientifiques* »⁶¹.

Les déchets d'activité de soins correspondent aux « *déchets des activités de diagnostic, de suivi et de traitement préventif, curatif ou palliatif, dans les domaines de la médecine humaine et vétérinaire* »⁶². Cela comprend les éléments présentant un risque infectieux (matériels consommables souillés), les objets piquants ou tranchants et les « *déchets anatomiques humains correspondant à des fragments non aisément identifiables* ». Des éléments issus du corps humain

⁵⁷ C. pén., article 225-17.

⁵⁸ Loi n°2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique ; C. civ., articles 16-1 et suivants.

⁵⁹ Arrêté du 16 septembre 2004 portant définition des normes d'identification, d'inventaire, de classement et de conditionnement de la documentation scientifique et du mobilier issu des diagnostics et fouilles archéologiques.

⁶⁰ Arrêté du 1 avril 1997 portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives au prélèvement des tissus et au recueil des résidus opératoires issus du corps humain utilisés à des fins thérapeutiques (Journal Officiel du 06/04/1997).

⁶¹ C. santé publ., article L1245-2.

⁶² C. santé publ., articles R1335-1 à R1335-8.

sont alors considérés au même titre que le matériel consommable utilisé au cours des activités de soins. Ces déchets sont tenus d'être éliminés par la personne qui les a produits et il doit être établi des documents attestant le suivi des opérations d'élimination. Dès leur production, ils doivent être séparés des autres déchets, collectés dans des emballages à usage unique, marqués et étiquetés. Leur élimination se fait par incinération⁶³.

L'utilisation des déchets opératoires peut apparaître comme une solution plus facile car la personne n'étant pas décédée, son consentement peut être obtenu plus facilement. Cependant, les protocoles de recherche peuvent être très lourds à monter et ceci est d'autant plus vrai si les personnes voulant mener la recherche ne sont pas des personnels médicaux. Les protocoles (e.g. le protocole de la Délégation interrégionale à la Recherche Clinique du CHU de Bordeaux⁶⁴) sont complexes et exhaustifs.

2.6. LES SCELLES JUDICIAIRES BIOLOGIQUES

Les scellés judiciaires biologiques sont des scellés judiciaires dont le matériel prélevé est d'origine biologique et le plus souvent d'origine humaine. Ils peuvent donc correspondre à des déchets anatomiques humains au sens de « *fragments non aisément identifiables* »⁶⁵ c'est-à-dire des fragments osseux, des fragments de tissus mous. Cependant, il est légitime de se demander qui est en charge d'identifier ces fragments et quel est le degré d'identification attendu ? En effet, pour le commun des mortels, il sera peut-être difficile d'identifier un fragment même important d'os ou de tissus mous alors que pour un technicien en identification criminelle, la nature humaine des objets devrait être plus évidente, et, évidemment, pour un médecin légiste, même un petit fragment d'os ou de tissu est facilement identifiable.

Les scellés ainsi constitués sont alors traités, analysés et seront conservés en vue d'analyses ultérieures si nécessaire. En fin de processus d'investigation, ces scellés seront détruits. La gestion des scellés est problématique et a fait l'objet de nombreuses discussions qui ont débouché sur la rédaction d'une circulaire⁶⁶ ayant pour ambition de « *répertorier l'ensemble des textes régissant la gestion des biens placés sous main de justice* » notamment quant à leur enregistrement, stockage, restitution, aliénation et destruction.

Lorsqu'une décision de justice est rendue et qu'aucun recours n'est possible, les biens placés sous scellés peuvent être restitués ou détruits. Les prélèvements biologiques ne peuvent pas être rendus à la famille. Les prélèvements réalisés dans le cadre de recherche des causes de la mort⁶⁷

⁶³ C. santé publ., article R1335-8.

⁶⁴ Consultable sur le site internet : <http://www.dirc-soom.fr/index.php/vous-souhaitez-construire-un-projet>.

⁶⁵ C. santé publ., article R1335-1.

⁶⁶ Circulaire conjointe du 13 décembre 2011 relative à la gestion des scellés, Bulletin Officiel du ministère de la justice et des libertés (NOR : JUSB1134112C)

⁶⁷ C. pr. pén., article 74.

sont réalisés sans nécessité d'obtention du consentement de la famille et ne leur sont pas restitués par la suite. Ces prélèvements constitueraient une source intéressante de matériel pour réaliser des recherches scientifiques et notamment pour l'estimation du délai *post mortem* car les conditions de conservation des échantillons sont connues, l'intervalle *post mortem* aussi.

2.7. DEVENIR DES INDIVIDUS ISSUS DES FINS DE CONCESSION DE CIMETIERES

En France, les concessions funéraires peuvent être temporaires, trentenaires, cinquantenaires ou perpétuelles⁶⁸. Elles font l'objet d'un titre de propriété établi entre le concessionnaire et la commune. Au décès du concessionnaire, la concession passe en état d'indivision perpétuelle et se transmet donc aux héritiers. En fin de validité de la concession, il appartient au concessionnaire d'effectuer les démarches de renouvellement auprès des services compétents de la mairie dans un délai de deux années révolues suivant la fin de sa validité⁶⁸. Passé ce délai, la concession peut être reprise par la mairie et revendue (sous réserve que la dernière inhumation au sein de la concession ait eu lieu il y a plus de 5 ans). Dans les cas d'abandon de concessions perpétuelles sur une période de plus de trente ans, attestée par le maire par procès-verbal et porté à la connaissance du public et des familles, la commune peut reprendre la concession⁶⁸. Si cette concession est entretenue, par quelque personne que ce soit, la concession perdure. Les sujets exhumés en fin de concession sont soit immédiatement réinhumés dans un ossuaire aménagé par la commune, soit incinérés en l'absence d'opposition connue ou attestée du défunt⁶⁸.

L'accès à un tel matériel serait très intéressant puisque tous les individus sont identifiés, cependant, le droit français n'autorise pas de telles démarches.

3. CONCLUSIONS

Face à l'antilogie entre le droit à la recherche – reconnue comme priorité nationale – et les droits dus au corps humains – tel le respect de la personne et de son intégrité corporelle – de nombreux débats bioéthiques ont eu lieu tendant à renforcer la jurisprudence dans des cas très précis mais ouvrant ainsi la voie à de nouvelles situations. Il est donc très important de trouver un équilibre entre les besoins de la recherche scientifique et le concept de respect de la personne.

Cet état des lieux rapide du statut juridique du corps humain en France, quant à son utilisation dans la recherche scientifique, nous a permis de constater qu'en dépit du nombre croissant de textes législatifs se référant à la question, de la publication de la loi relative à la bioéthique (2004), il existait encore des notions non définies qui autorisaient dans une certaine

⁶⁸ CGCT, articles L2223-4, L2223-14, L2223-15, L2223-17 et L2223-18.

mesure l'utilisation du corps humain, de ses éléments et produits. Cette utilisation n'est donc pas strictement interdite mais ne peut cependant se faire que sous certaines conditions – par exemple avec l'obtention du consentement, avec le respect de la dignité, avec le respect dû aux morts – qui nécessitent la mise en place de protocoles de recherche relativement lourds. Dans le cadre ce projet de thèse, de par la lourdeur administrative associée à la frilosité des comités nationaux d'éthique à autoriser certains projets de recherche, nous avons été amenée à considérer les réponses apportées par les législations étrangères. À défaut de créer une jurisprudence relative à chaque situation, et afin de mener des projets de recherche plus rapidement, une alternative envisageable serait donc de se tourner vers les pays étrangers autorisant ce type de recherche. Il en est déjà ainsi avec les « fermes des corps » américaines, qui autorisent la mise en place d'études taphonomiques dans différentes conditions sur des cadavres donnés à ces fins. Cependant, rechercher la solution à l'étranger demande aussi beaucoup de temps et de moyens, éléments non négligeables et souvent limitatifs dans le cadre d'un projet de recherche doctorale.

TROISIEME PARTIE

De l'atome à la molécule : Introduction à la
spectroscopie de Résonance Magnétique
Nucléaire

Cette partie est destinée à expliquer de façon simplifiée les bases de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), sans intégrer l'approche quantique qui serait nécessaire pour une compréhension totale du phénomène, mais qui permet tout de même une interprétation des spectres (Günther 1996 ; Canet *et al.* 2002 ; Silverstein *et al.* 2007).

La RMN désigne une propriété de certains noyaux atomiques possédant un spin nucléaire non nul (par exemple l'hydrogène-1 ou ^1H , le carbone-13 ou ^{13}C , le phosphore-31 ou ^{31}P), placés dans un champ magnétique qui les polarise. Lorsqu'ils sont soumis à un rayonnement électromagnétique (radiofréquence), le plus souvent appliqué sous forme d'impulsions, les noyaux atomiques peuvent absorber l'énergie du rayonnement puis la relâcher lors de la relaxation. L'énergie mise en jeu lors de ce phénomène de résonance correspond à une fréquence très précise, dépendante du champ magnétique et d'autres facteurs moléculaires. Ce phénomène permet donc l'observation des propriétés quantiques magnétiques des noyaux dans les phases gazeuse, liquide ou solide. Le phénomène de RMN est exploité par la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (Spectroscopie RMN) en physique et chimie (*e.g.* chimie organique, chimie inorganique, science des matériaux) ou en biochimie (structure de molécules). Cependant, l'application sans doute la plus connue du grand public est l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) utilisée en médecine, mais également en chimie.

Il est à noter qu'il existe un phénomène parallèle pour les électrons non appariés, c'est la résonance de spin électronique (ESR) ou résonance paramagnétique électronique (RPE) dont est issue une méthode de datation utilisée à des fins géochronologiques depuis la fin des années 1970 (Grün 1989).

1. PROPRIETES MAGNETIQUES DES NOYAUX ATOMIQUES

Schématiquement, on peut assimiler le noyau d'un atome (qui est composé de neutrons et de protons) à une sphère chargée positivement et tournant sur elle-même. Chaque noyau est caractérisé par un **nombre quantique de spin** ou **moment de spin nucléaire (I)** déterminé selon la composition en particules élémentaires constituant le noyau :

- Pour les noyaux ayant un nombre pair de protons et de neutrons (*i.e.* carbone-12 ou ^{12}C (6 protons + 6 neutrons) ; oxygène-16 ou ^{16}O (8 protons + 8 neutrons)), le nombre quantique de spin I est nul ($I = 0$) et ils ne possèdent donc pas de spin nucléaire ;
- Pour les noyaux possédant un nombre de masse A (somme du nombre de neutrons et de protons) impair, le nombre de spin est un demi-entier (par exemple $I = \frac{1}{2}$ ou $\frac{3}{2}$ ou $\frac{5}{2}$) ;

- Et enfin, pour les noyaux ayant un nombre de protons et un nombre de neutrons impairs, le spin est un nombre entier (par exemple $I = 1$ ou 2) (Canet *et al.* 2002).

Seuls les isotopes (noyaux) atomiques qui ont un spin nucléaire non nul ($I \neq 0$) sont sujets au phénomène de RMN et peuvent donc être étudiés en spectroscopie RMN (Günther 1996 ; Canet *et al.* 2002 ; Silverstein *et al.* 2007). En effet, lorsque $I \neq 0$, la rotation intrinsèque du noyau crée un petit champ magnétique appelé **moment magnétique nucléaire** (μ) régit par la relation :

$$\mu = \gamma I \quad [1]$$

où γ est le **rapport gyromagnétique** caractéristique d'un noyau donné.

En pratique, les noyaux ayant un spin de $\frac{1}{2}$ présentent une distribution quasi sphérique des électrons autour de celui-ci, ce qui crée une interaction uniforme avec un champ magnétique extérieur (communément appelé B_0), ils fournissent donc des spectres qui sont plus faciles à interpréter que pour les noyaux dont le spin est supérieur à $\frac{1}{2}$. En effet, dans ce cas, la distribution des charges n'est plus sphérique et il y a apparition d'un moment quadripolaire électrique.

En chimie organique, les noyaux les plus susceptibles de fournir des informations sont ceux de carbone, d'oxygène et d'hydrogène. Le noyau de l'atome d'hydrogène est composé d'un seul proton, donc on parle communément de RMN du proton ou RMN ^1H . Cependant, pour les autres noyaux, comme nous venons de le voir, le carbone-12 et l'oxygène-16 présentent un nombre de spin nul donc ils ne peuvent pas être étudiés en spectroscopie RMN. Fort heureusement, ce n'est pas le cas pour le carbone-13 (^{13}C) qui, bien que peu abondant naturellement (1,108 %), permet d'être analysé. Concernant l'oxygène, le seul isotope permettant l'application de la spectroscopie RMN est l'oxygène-17 (^{17}O), néanmoins, son abondance naturelle est vraiment très faible (0,037 %) et est associée à un spin de $5/2$ ce qui rend l'obtention de résultats satisfaisants techniquement difficile (Silverstein *et al.* 2007).

En biologie, les noyaux les plus souvent étudiés sont, entre autres, ceux du phosphore-31 ^{31}P , de l'azote-14 ^{14}N et de son isotope naturel l'azote-15 ^{15}N , du sodium-23 ^{23}Na , ainsi que du potassium-39 ^{39}K .

2. EXCITATION DES NOYAUX DE SPIN $\frac{1}{2}$

En l'absence de champ magnétique extérieur, tous les noyaux d'un échantillon macroscopique, quel que soit leur moment magnétique nucléaire μ , ont la même énergie : on dit que tous les états magnétiques du noyau sont **dégénérés**. Lorsque les noyaux, de spin nucléaire non nul, sont placés dans un champ magnétique B_0 , on observe alors la séparation des états quantiques du moment magnétique, on parle de **levée de dégénérescence ou effet Zeeman**. Pour

un noyau donné, il existe $2I + 1$ orientations possibles du dipôle magnétique dans ce champ magnétique statique représentées par $2I + 1$ **états quantiques différents** (Figure 14) (Günther 1996 ; Canet *et al.* 2002 ; Silverstein *et al.* 2007).

Si nous prenons l'exemple de l'hydrogène ^1H pour lequel $I = \frac{1}{2}$, il existe donc deux états énergétiques possibles ($2I + 1 = 2$) qui sont généralement notés α et β , correspondant à l'orientation des moments magnétiques nucléaires dans ce champ. On retrouvera une orientation sensiblement parallèle à B_0 , (α , position la plus stable), et une sensiblement antiparallèle (β , position la moins stable). Pour un échantillon macroscopique, la statistique de Boltzmann prédit qu'il y a légèrement plus de noyaux orientés parallèlement au champ B_0 .

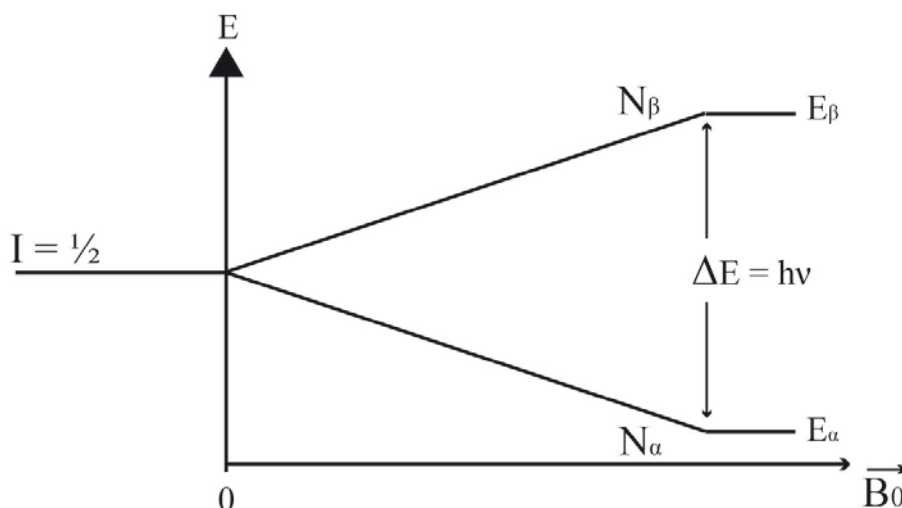


Figure 14 – Levée de dégénérescence et états énergétiques, E_α , E_β , en présence d'un champ magnétique B_0

Le rapport entre les deux populations (N_α et N_β), pour un champ magnétique B_0 de 1,4 Tesla est (Günther 1996 ; Canet *et al.* 2002 ; Silverstein *et al.* 2007) :

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} \approx 1 - \frac{\gamma \hbar B_0}{2\pi kT} \approx 0,9999911 \quad [2]$$

où h est la **constante de Planck**, k la **constante de Boltzmann**, T la **température** en kelvin, B_0 le **champ magnétique** en Tesla et γ le **rapport gyromagnétique** en $\text{rad.T}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Cette différence, bien que faible, se manifeste par l'apparition d'une **aimantation nucléaire macroscopique (M)** dirigée dans la direction du champ B_0 (Figure 15). En RMN, c'est cette légère différence de population entre niveaux d'énergie qui est mesurée. De ce fait, on comprend l'intérêt qu'il y a à utiliser le champ magnétique le plus fort possible.

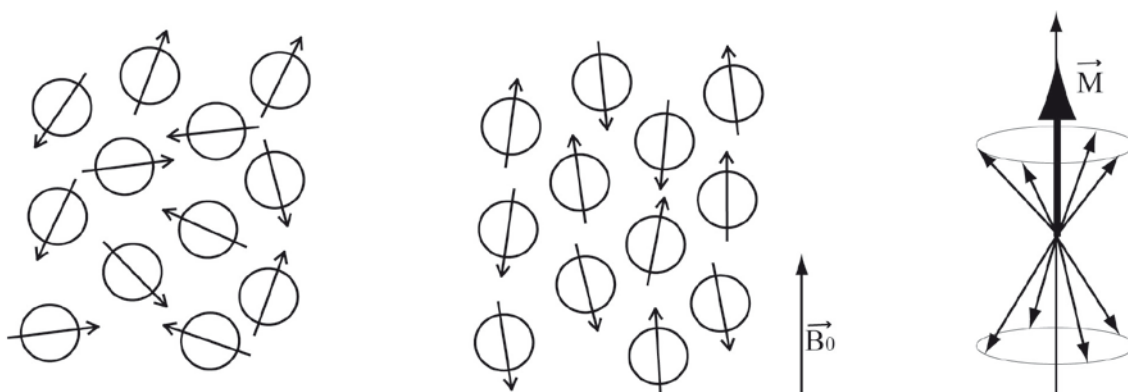


Figure 15 – Orientation des noyaux de spins $1/2$ en fonction du champ magnétique d'intensité B_0 , et aimantation résultante M

Dans une description en mécanique classique, le moment magnétique μ plongé dans B_0 est animé d'un mouvement de précession autour de B_0 analogue à celui d'une toupie (Figure 16), ce mouvement est appelé **précession de Larmor** et est régi par la relation de Larmor :

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad [3]$$

où ω_0 est la **vitesse angulaire de rotation**.

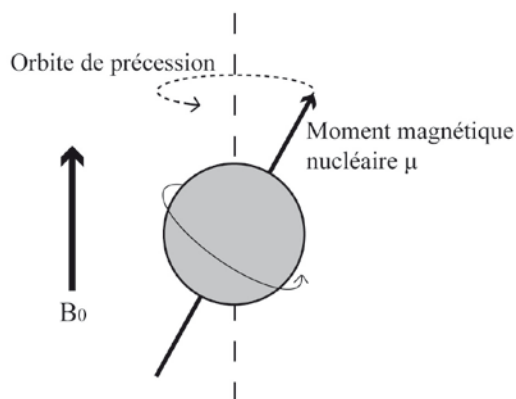


Figure 16 – Proton en précession dans un champ magnétique d'intensité B_0

La fréquence de résonance ou **fréquence de Larmor** (ν_0), qui est la fréquence à laquelle a lieu la transition entre les deux niveaux d'énergie, est proportionnelle au champ appliqué selon la relation :

$$\Delta E = E_\beta - E_\alpha = h \nu_0 \quad \text{avec} \quad \nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad [4]$$

Le nombre de spin I ainsi que la fréquence de résonance ν_0 sont caractéristiques de chaque isotope et sont présentés, pour les isotopes les plus courants, dans le tableau suivant (Tableau 3) :

Tableau 3 – Nombre de spin, fréquence de résonance et abondance naturelle des principaux noyaux étudiés en spectroscopie RMN (d'après Günther 1996 ; Canet et al. 2002 ; Silverstein et al. 2007)

Noyau	I	ν_0 (MHz)	Abondance Naturelle (%)
^1H	$\frac{1}{2}$	100	99,98
^2H	1	15,351	0,015
^{13}C	$\frac{1}{2}$	25,144	1,108
^{17}O	$\frac{5}{2}$	13,557	0,037
^{14}N	1	7,224	99,63
^{15}N	$\frac{1}{2}$	10,133	0,37
^{31}P	$\frac{1}{2}$	40,481	100
^{19}F	$\frac{1}{2}$	94,077	100

L'intensité du champ magnétique est exprimée en **Tesla** (T) unité internationale du champ d'induction magnétique (1 Tesla = 10 000 Gauss, la moyenne du champ magnétique terrestre étant de 0,5 Gauss). En RMN, plutôt que d'indiquer la valeur de B_0 , on donne généralement la fréquence de résonance du proton (100 MHz correspond à 2,35 T ; 500 MHz à 11,7 T ; ainsi de suite). Cependant, l'aimantation M générée par l'excès de moments magnétiques parallèlement à B_0 est trop faible comparée à B_0 pour être observable, il faut donc la faire basculer perpendiculairement à B_0 pour pouvoir la détecter.

L'**aimantation résultante M** peut s'exprimer comme suit (Günther 1996 ; Canet *et al.* 2002 ; Silverstein *et al.* 2007) :

$$M = \frac{N\gamma^2 B_0 I(I+1)}{kT} \quad [5]$$

où N est le **nombre de noyaux**.

Cette relation montre que la RMN est donc une technique quantitative puisque la mesure de l'aimantation résultante M est directement proportionnelle au nombre de noyaux N présents dans l'échantillon analysé.

3. LA DETECTION DU SIGNAL RMN

3.1. LE SPECTROMETRE

La bobine supraconductrice permet de produire un champ magnétique intense. Cette supraconduction lui est conférée par les matériaux la composant et par la très faible température

qui est maintenue grâce à un réservoir d'hélium liquide à 4 kelvins lui même compris dans un réservoir d'azote liquide à 77 kelvins. À ces températures, le courant présent dans la bobine ne subit aucune perte par effet Joule, l'homogénéité du champ face aux perturbations extérieures est ensuite assurée par la présence de bobines additionnelles qui corrigent le champ dans l'espace (à cause d'une légère instabilité spatiale le long de la bobine), on parle de « shim ». Ainsi, l'acquisition d'un spectre avec une homogénéité spatiale du champ adéquate permet l'obtention de raies plus fines. Il faut aussi réaliser des corrections du champ dans le temps de l'acquisition (instabilité temporelle) car le champ B_0 peut varier légèrement ce qui entraîne un élargissement des raies, on parle alors de « lock ».

Un système de générateur de fréquence et d'amplificateurs de puissance du champ radiofréquence B_1 fournit un signal sinusoïdal modulé à la fréquence ν_0 . Un générateur d'impulsions permet d'émettre le signal sous forme d'impulsions. C'est le même dispositif qui est responsable de la perturbation du système de spin (aimantation résultante) puis de sa réception. Le signal reçu est ensuite démodulé par rapport à la fréquence ν_0 transformé en signal basse fréquence, amplifié, numérisé et traité informatiquement (Figure 17).

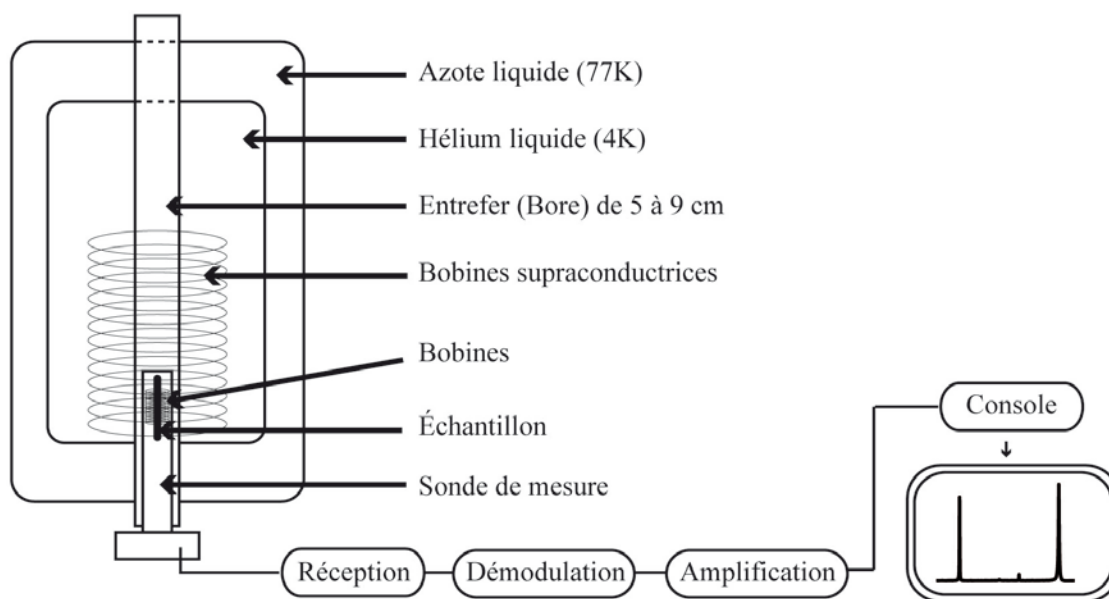


Figure 17 – Schéma simplifié d'un spectromètre de résonance magnétique nucléaire

3.2. LE PHENOMENE DE RESONANCE

Si on applique sur l'échantillon, perpendiculairement au champ principal B_0 , un deuxième champ de radiofréquence B_1 , oscillant à une fréquence ν_0 , le champ B_1 interagit avec les spins et perturbe leur distribution entre les niveaux d'énergie due au champ fixe B_0 . Il y a alors bascule

de l'aimantation M hors de sa position d'équilibre : c'est ce que l'on appelle le **phénomène de résonance**.

Lorsque l'énergie du rayonnement électromagnétique correspond à la différence d'énergie entre les deux niveaux d'énergie, celui-ci peut être absorbé par le noyau atomique, on parle alors de transition spectroscopique.

3.3. LA RELAXATION

Le retour à l'équilibre de l'aimantation par un processus non radiatif dû à un échange d'énergie et d'entropie avec le milieu contenant les noyaux est appelé **relaxation magnétique nucléaire**, elle présente une composante longitudinale selon l'axe de B_0 ou z , et une composante transversale selon les axes x et y (Günther 1996 ; Canet *et al.* 2002 ; Silverstein *et al.* 2007). En RMN, la durée de cette relaxation peut aller de quelques microsecondes à plusieurs centaines de secondes (Figure 18).

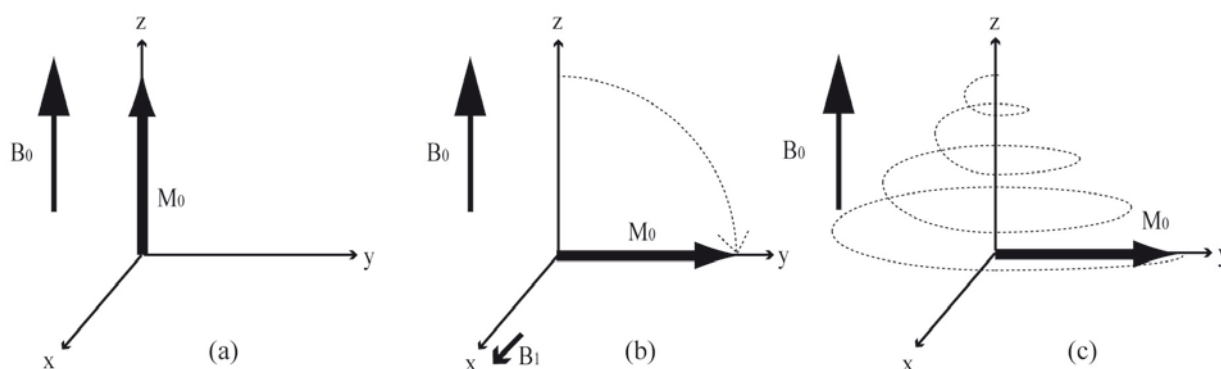


Figure 18 – Retour à l'équilibre de l'aimantation M_0 après arrêt de l'application du champ B_1

(a) Aimantation M_0 parallèle au champ B_0 ; (b) Bascule de M_0 autour de B_1 ; (c) Retour à l'état d'équilibre de M_0 grâce à la relaxation magnétique nucléaire

La **relaxation longitudinale** selon l'axe z , de constante de temps T_1 , permet au système de spins de retourner à l'équilibre selon un processus en général monoexponentiel. Cette relaxation T_1 est liée aux phénomènes de fluctuations des champs magnétiques locaux, cependant, seuls ceux ayant une fréquence de résonance proportionnelle à la fréquence de Larmor peuvent provoquer les transitions énergétiques entre états quantiques nécessaires au retour à l'équilibre. Lors de cette relaxation, le système de spin cède de l'énergie à son environnement (ou réseau) d'où, la dénomination de relaxation spin-réseau.

La **relaxation transversale** selon les axes x et y , de constante de temps T_2 décroît aussi de manière monoexponentielle. En plus des phénomènes précédents, la relaxation transversale est

soumise à l'influence des fluctuations dans les fréquences de résonance de spins individuels d'où sa dénomination de relaxation spin-spin. Le signal correspondant à T_2 , enregistré dans les directions x ou y au cours d'une acquisition de spectroscopie RMN, est représenté sous la forme d'une sinusoïde amortie appelée signal de précession libre ou FID (Free Induction Decay) (Figure 19).

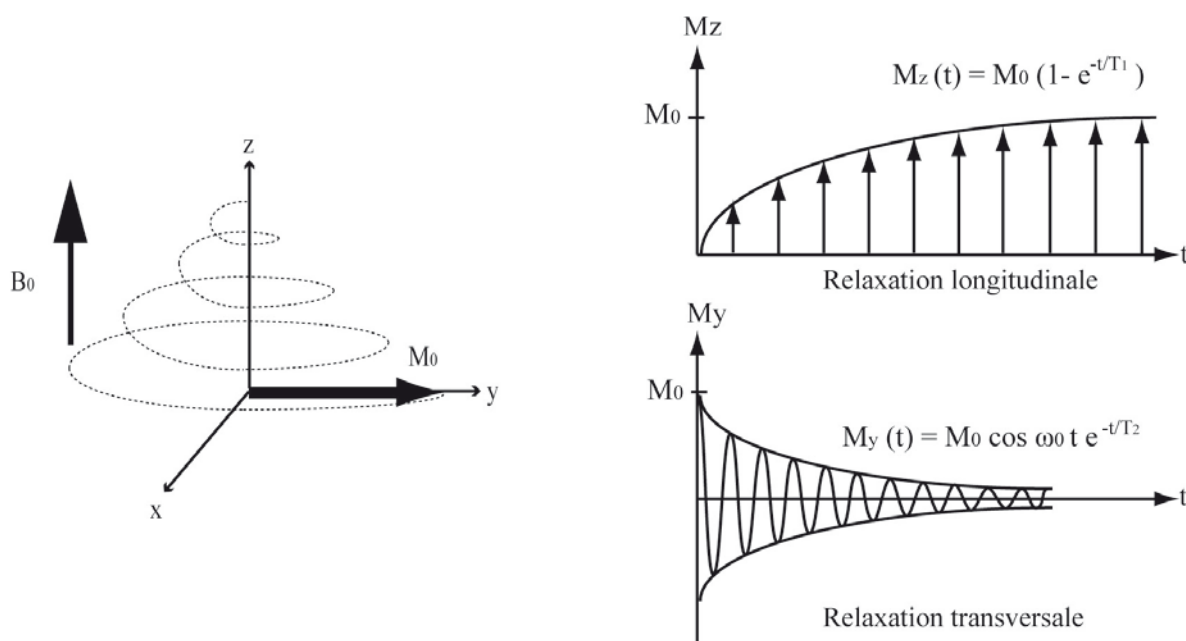


Figure 19 – Retour à l'état d'équilibre de l'aimantation selon M_z (relaxation longitudinale T_1) et selon M_y (relaxation transversale T_2)

3.4. LA TRANSFORMÉE DE FOURIER

Le signal de RMN enregistré (FID) au cours de la phase de relaxation ne contient rarement qu'une seule fréquence, il s'agit plutôt de la détection simultanée de plusieurs fréquences différentes. La transformée de Fourier permet le passage d'un signal temporel (enregistrement du signal pendant la durée de l'acquisition) à un signal fréquentiel exprimé en s^{-1} ou Hz et donc d'obtenir un spectre où chaque pic représente une fréquence de résonance (Figure 20).

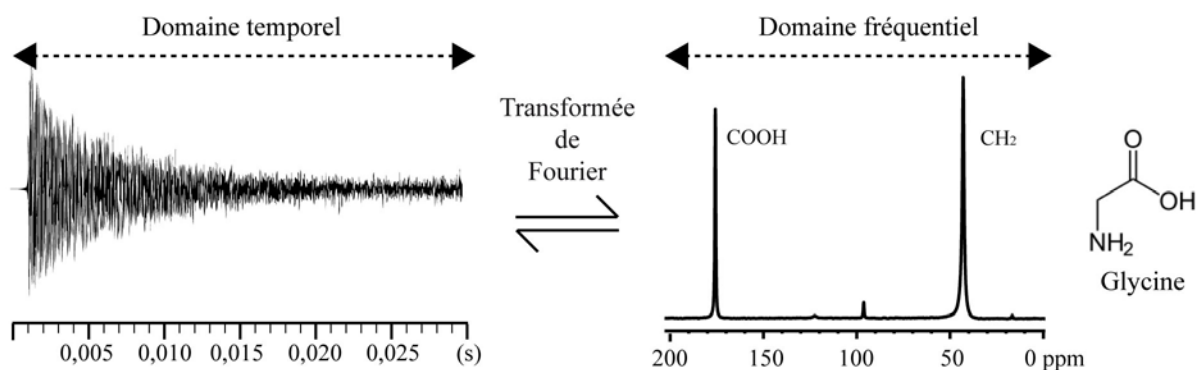


Figure 20 – Signal enregistré (FID) au cours d'une acquisition en RMN du carbone-13 de la glycine et représentation spectrale après transformée de Fourier

La fréquence effective nécessaire à l'absorption d'énergie permet donc de caractériser l'environnement des noyaux étudiés au niveau intramoléculaire. L'écart entre fréquence d'absorption et fréquence théorique n'est que de quelques centaines de hertz dans un champ magnétique faisant plusieurs centaines de mégahertz. Cette constante étant difficile à mesurer de par sa faible valeur, on l'habitude de la déterminer par rapport à une molécule de référence standard, en général le tétraméthylsilane ou TMS, qui présente une fréquence placée par convention internationale à 0. Ceci permet de définir le paramètre δ de déplacement chimique selon la relation :

$$\delta = 10^6 (\sigma_{ref} - \sigma) = 10^6 \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \quad [6]$$

où δ s'exprime en parties par million (ppm). Nous constatons que δ n'a pas d'unité et est indépendant de B_0 . Par convention, lors de la lecture d'un spectre de RMN, le déplacement chimique δ croît de droite à gauche. Plus le blindage électronique augmente (*vide infra*), plus la constante d'écran σ augmente et moins le déplacement chimique δ est important (Figure 21).

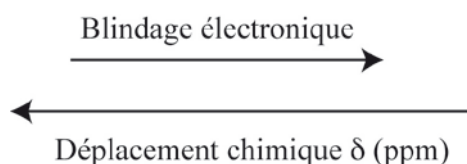


Figure 21 – Relation entre le blindage électronique (σ) et le déplacement chimique (δ)

3.5. REPETITION ET TRAITEMENT DU SIGNAL

La séquence d'impulsions est répétée de nombreuses fois (n fois) afin d'extraire au mieux le signal du bruit de fond. Le signal total (S) est donc égal à la somme des signaux issus de chaque impulsion, l'accumulation de deux mesures successives double l'intensité du signal. En revanche, le bruit total (B) étant aléatoire, l'accumulation de deux mesures augmente le bruit en puissance () et non plus en intensité. Après n mesures, le signal total est donc égal à $S = ns$ alors que le bruit total est lui égal à $B = \sqrt{n}b$. L'augmentation du nombre de mesures n permet d'améliorer le rapport S / B de \sqrt{n} .

4. LES INTERACTIONS INTERNES ET L'INTERPRETATION DES SPECTRES

Les échantillons sont soumis à des interactions externes essentiellement les champs magnétiques B_0 et B_1 permettant la mesure du signal et à des champs internes qui permettent l'obtention d'informations sur la structure et la dynamique des noyaux des atomes étudiés.

4.1. LE DEPLACEMENT CHIMIQUE

On a pu donc voir que la fréquence de résonance ν_0 dépend du moment gyromagnétique γ (caractéristique du noyau) et de B_0 : cela pourrait amener à l'hypothèse que tous les noyaux de même type résonnent à la même fréquence. Or, chaque noyau possède un environnement chimique légèrement différent ce qui va influencer sa fréquence de résonance : c'est le **déplacement chimique δ** .

Dans un champ magnétique, la présence des électrons autour du noyau ou nuage électronique engendre un champ magnétique local induit B_i en général opposé à B_0 : on parle alors de blindage électronique caractérisé par une grandeur σ appelée **constante d'écran**. Plus la densité électronique autour du noyau est grande et plus la constante d'écran est élevée. Le champ ressenti par le noyau est donc inférieur au champ réellement appliqué. Il faut alors appliquer un champ effectif B_{eff} plus important :

$$B_{\text{eff}} = B_0(1 - \sigma) \quad [7]$$

où σ est la **constante d'écran**.

Selon les isotopes étudiés, les gammes de déplacements chimiques varient d'une dizaine de ppm pour le proton à plus de 200 ppm pour le carbone-13. Cependant, le nuage électronique n'explique pas à lui seul toutes les variations du déplacement chimique que nous observons sur

les spectres RMN ; en effet, la valeur du déplacement chimique permet aussi d'approcher les relations de nature intermoléculaire comme la présence de protons mobiles, la proximité de cycle aromatique et le pH entre autres.

4.2. LES INTERACTIONS DIPOLAIRES MAGNETIQUES

Il existe également des interactions entre moments magnétiques, elles peuvent se faire soit directement à travers l'espace (couplage direct), soit par l'intermédiaire des électrons de liaison (couplage indirect, scalaire ou J).

4.2.1. Couplage direct

Le couplage dipolaire direct dépend de la distance r_{AB} entre deux noyaux A et B ainsi que de leurs rapports gyromagnétiques (γ_A et γ_B). Il en résulte un déplacement des niveaux d'énergie se traduisant par un dédoublement des pics donné par la relation :

$$\Delta \nu_{AB} = C \left(\frac{\gamma_A \gamma_B}{r_{AB}^3} \right) \left(\frac{3 \cos^2 \theta_{AB} - 1}{2} \right) \quad [8]$$

où l'angle θ_{AB} représente l'orientation du vecteur entre les noyaux A et B par rapport à B_0 , et C une constante numérique.

Dans les liquides, les mouvements moléculaires sont très rapides avec une réorientation permanente ce qui annule le facteur $(3 \cos^2 \theta_{AB} - 1)$. De ce fait, l'éclatement n'a pas lieu et le couplage dipolaire direct est donc annulé ; ce couplage est cependant perçu dans l'effet Overhauser nucléaire (*vide infra*). Dans les solides, ce couplage élargit les spectres de manière importante, la mesure de cette constante permet de calculer des distances interatomiques (Gullion et Schaefer 1989).

4.2.2. Couplage indirect, scalaire ou J

Le couplage scalaire est dû à une interaction magnétique entre deux spins A et B transmise par les électrons de la liaison chimique. Ce couplage peut être homonucléaire c'est-à-dire entre deux noyaux de même nature ou hétéronucléaire entre noyaux de nature différente. On appelle nJ la constante de couplage (n exprimant le nombre de liaisons entre les spins). J s'exprime en hertz et est indépendante de B_0 (Figure 22).

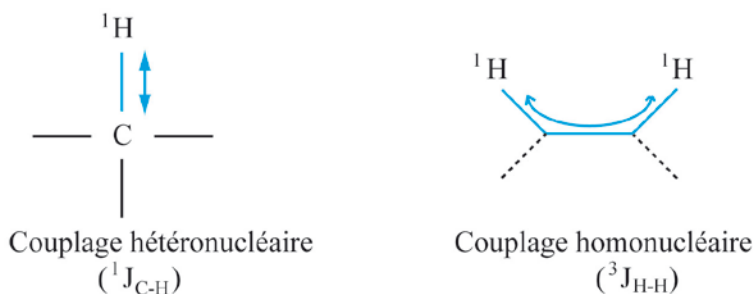


Figure 22 – Couplage scalaire hétéronucléaire à une liaison ($^1J_{C-H}$) et homonucléaire à trois liaisons ($^3J_{H-H}$)

Sur les spectres RMN, l'expression de ce couplage scalaire apparaît sous la forme d'un dédoublement de pics. Suivant le type, le nombre d'atomes et le type de couplage considérés, le signal apparaîtra sous forme de doublet, triplet, quadruplet ou plus. On peut éliminer ce couplage afin de rendre la lecture des spectres plus facile à l'aide d'une technique spéciale, le découplage, qui consiste à irradier de manière ciblée certains noyaux pour les rendre « invisibles » ce qui permet de visualiser d'autres noyaux.

4.2.3. L'interaction quadripolaire

L'interaction quadripolaire ne se produit qu'en présence d'isotopes ayant un spin supérieur ou égal à 1. Elle se différencie par l'apparition d'un moment quadripolaire électrique n'existant pas pour les noyaux ayant un spin égal à $\frac{1}{2}$. Nous ne développerons pas cet aspect théorique puisque les seuls noyaux que nous étudierons dans le cadre de ce travail ont des spins égaux à $\frac{1}{2}$ et ne présentent donc pas de moment quadripolaire électrique.

5. RMN DES LIQUIDES ET DES SOLIDES

Au sein d'un liquide, à cause du mouvement brownien des molécules, on considère que l'environnement moléculaire est le même quelle que soit la direction : on parle de **milieu isotrope**. Les valeurs sont moyennées dans toutes les orientations de l'espace et déterminent deux conditions : les mouvements moléculaires sont très rapides par rapport aux interactions affectant les spins nucléaires ; et, la molécule adopte, avec la même probabilité, toutes les orientations possibles. Lorsque ces conditions ne sont pas remplies, on définit donc un **milieu anisotrope** (solide, cristal, poudre, cristaux liquides, matière molle, membrane biologique) et on parle de RMN des solides.

Les interactions magnétiques dépendent alors de l'orientation des molécules dans B_0 . Au premier ordre, cette dépendance angulaire prend la forme $\frac{3\cos^2\theta - 1}{2}$, ce qui conduit à des formes de spectres complexes et très étendus en fréquence (dizaine à centaine de kHz), également, dans les solides, les raies obtenues sont élargies par rapport à la RMN des liquides de par la lenteur des mouvements moléculaires. Il devient alors très difficile de différencier les groupements chimiques en présence. Cependant, il est possible de moyennner les interactions subies par l'échantillon en le faisant tourner autour d'un axe incliné de $54,74^\circ$ par rapport à B_0 . Cet angle est appelé **angle magique** et on parle de rotation à l'angle magique ou MAS (Magic Angle Spinning) (Figure 23).

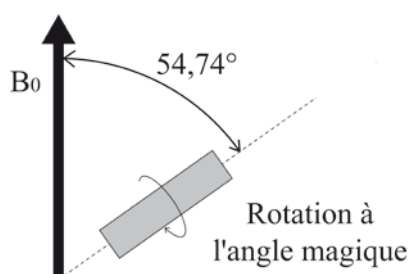


Figure 23 – Rotation à l'angle magique (MAS)

Les termes $\frac{3\cos^2\theta - 1}{2}$ sont moyennés à zéro si la vitesse de rotation est suffisamment rapide. Pendant les acquisitions RMN, l'échantillon est mis en rotation très rapidement autour de son axe longitudinal (une dizaine de kHz). Si la vitesse de rotation n'est pas assez rapide, on voit alors apparaître des **bandes latérales de rotation** multiples de la vitesse de rotation, ce qui permet de les identifier et de les dissocier des autres pics informatifs de la composition de l'échantillon (Figure 24) (Günther 1996). La rotation permet donc d'obtenir des spectres haute résolution en phase solide (Canet *et al.* 2002).

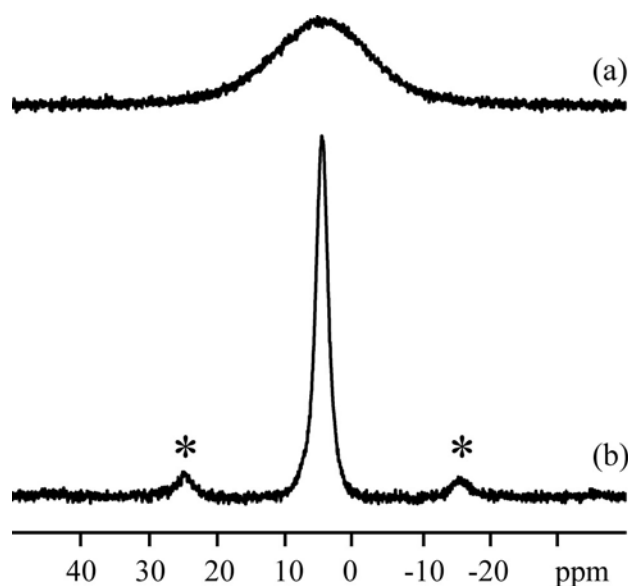


Figure 24 – Spectres obtenus en RMN du phosphore-31 d'un échantillon de dent

(a) sans rotation et (b) avec une rotation de l'échantillon à l'angle magique à une vitesse de 4 kHz

* : bande de rotation

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du phosphore ; 8 acquisitions ; $D_1 = 60$ s ; $P_1 = 6,75$ μs ; température ambiante ; masse = 100 mg.

6. SPECIFICITES DE LA SPECTROSCOPIE DE RMN DU CARBONE-13

Le carbone-12 (^{12}C) possédant un spin nucléaire nul ($I = 0$), les analyses en chimie organique se sont reportées sur le noyau ^{13}C qui présente une faible abondance naturelle (1,1 %) et une sensibilité relative par rapport au proton de 1,6 %, ce qui fait que sa sensibilité globale est de 1/5681.

Les particularités de la spectroscopie RMN du ^{13}C sont les suivantes :

- Sa faible abondance naturelle rend la probabilité d'avoir deux ^{13}C adjacents au sein d'une molécule faible : les difficultés d'interprétation du spectre due au couplage ^{13}C - ^{13}C sont donc évitées.
- Les gammes de déplacements chimiques du ^{13}C sont beaucoup plus importantes que celle du proton donc il y a une meilleure séparation des pics.
- Le temps d'acquisition des spectres ^{13}C est plus long que pour les protons du fait de la faible abondance naturelle associée à un temps de relaxation plus long.
- Il y a beaucoup plus de bruit de fond.
- L'acquisition du spectre se fait en découplant les protons : ceci permet d'avoir une disparition virtuelle des protons et l'apparition de singulets représentant chaque ^{13}C .
- Le transfert de polarisation des protons vers les carbones liés à ces protons permet d'observer les carbones avec une sensibilité proche de celle des protons.

En RMN des liquides du ^{13}C , une des techniques permettant d'obtenir une augmentation du signal des noyaux de carbone-13 s'appelle le découplage. On peut bénéficier d'une augmentation de signal par l'**effet Overhauser nucléaire** NOE (Nuclear Overhauser Effect). Le découplage peut être homonucléaire s'il concerne deux noyaux de nature identique ou hétéronucléaire dans les autres cas.

Concernant le **découplage**, si on considère deux protons I et S non équivalents (environnements différents), le spectre RMN ^1H présentera alors deux pics à δ_I et δ_S ppm. Si au cours de l'acquisition du spectre on sature le proton S (on égalise les populations α et β) par l'application d'un champ radiofréquence à la fréquence de résonance de S , le signal correspondant à ce proton va disparaître. Si les spins de I et S sont couplés, un phénomène de relaxation croisée va permettre le transfert de l'aimantation du spin saturé S vers le spin I . Ce transfert de polarisation va entraîner une variation de l'intensité du signal du proton I en fonction de l'existence d'une interaction dipolaire importante entre ces deux protons.

Cette technique appelée « Cross polarization » ou CP permet d'obtenir un accroissement du signal remarquable, en particulier si on transfère l'énorme polarisation des protons de l'échantillon, très abondants, aux atomes de carbone-13 ^{13}C , peu abondants (Metz *et al.* 1996). C'est une technique très utilisée en milieu solide, qui alliée à la rotation rapide de l'échantillon à l'angle magique, permet d'obtenir des spectres en RMN ^{13}C bien résolus et relativement intenses. Cette technique a été utilisée dans cette thèse.

QUATRIEME PARTIE

Matériels et méthode

Chapitre 4.1

Collections ostéologiques étudiées et matériels consommables utilisés

Le matériel osseux utilisé dans le cadre de ce travail provient de différentes sources. De ce fait, il présente une hétérogénéité en termes de quantité de sujets échantillonnés et de précision des informations collectées.

Pour qu'un échantillon soit intégré dans la collection étudiée, il fallait impérativement connaître le type d'os échantillonné et la date de décès (qu'elle soit exacte ou estimée de manière fiable). Ensuite, toutes les informations complémentaires pouvant être recueillies l'étaient : sexe, date de naissance, âge au décès, milieu de conservation, conditions de conservation, protocole de nettoyage des os.

Afin de compléter cette collection, nous avons réalisé une étude contrôlée sur des os de cochon domestique (*Sus scrofa*) sur une période de deux ans. Les paramètres étudiés sont alors les conditions de dépôt des os (enterré, à l'air libre) en fonction de l'intervalle *post mortem* (0, 1 et 2 ans).

Notre corpus total comprend 119 échantillons : 112 de nature humaine provenant de 98 sujets différents et 7 échantillons de faune.

À ce matériel ostéologique s'ajoutent les produits chimiques que nous avons utilisés tout au long de ce travail que ce soit des solvants pour le nettoyage du petit matériel ou utilisés directement pour les acquisitions RMN.

1. OS HUMAINS DE DIFFERENTS DELAIS *POST MORTEM*

1.1. COLLECTION SIMON (GENEVE, SUISSE)

En 1991, sous la direction de Christian Simon, Isabelle Gemmerich a entrepris, dans le cadre d'une thèse de doctorat en anthropologie (Gemmerich 1999), la création d'une collection anthropologique de référence. La constitution de la collection s'est déroulée sur le territoire vaudois au cours de la désaffectation partielle de cimetières actuels (Perréard Lopreno 2006). Un des objectifs de cette collection était l'obtention de squelettes complets, présentant une bonne

conservation et dont les informations concernant l'âge, le sexe, l'état civil voire la cause de décès étaient connues. Les os n'ont fait l'objet d'aucun nettoyage spécifique et sont stockés dans des caisses individuelles.

Initialement, les cimetières de onze communes ont été fouillés ce qui représente un corpus de 151 individus (Gemmerich 1999). Secondairement, entre 1998 et 2003, seize campagnes de fouilles ont été menées pour une collection actuelle composée de 496 individus issus de 27 communes (dates de naissance comprises entre 1840 et 1948 ; dates de décès comprises entre 1915 et 1969 ; âges compris entre 0 et 93 ans) (Perréard Lopreno 2006). L'échantillon formé est représentatif de la population de la fin du XIX^e et de la première moitié du XX^e siècle. En effet, il appartient à un contexte géographique (Bassin lémanique), chronologique (fin XIX^e siècle – début XX^e siècle) et social homogène (Gemmerich 1999).

Le corpus que nous avons échantillonné comprend 5 individus. Le recrutement s'est fait selon le sexe (ils sont tous de sexe masculin) puis selon leur date de décès, leur âge au décès puis leur origine géographique. Trois sujets sont donc issus du même cimetière (identifiant AIG), décédés la même année, et ont un âge au décès sensiblement identique. Un sujet est décédé la même année mais a été inhumé dans un cimetière différent (identifiant VAL). Et enfin, un sujet présente une date de décès plus ancienne et a été inhumé dans un cimetière différent (identifiant TRE) (Tableau 4).

Tableau 4 – Liste des individus échantillonnés de la collection Simon (Genève, Suisse)

Identifiant	Os	Sexe	Date naissance	Date de décès	Âge au décès	Conservation
Simon VAL-06	Fémur	M	1904	1954	50	Cercueil
Simon TRE-11	Fémur	M	1877	1922	45	Cercueil
Simon AIG-10	Fémur	M	1912	1954	42	Cercueil
Simon AIG-43	Fémur	M	1913	1954	41	Cercueil
Simon AIG-48	Fémur	M	1905	1954	49	Cercueil
Total n = 5						

M : Homme

La campagne d'échantillonnage s'est déroulée du 20 au 22 juin 2012 au sein du Laboratoire d'archéologie préhistorique et anthropologie de l'université de Genève (Suisse) après accord du Pr Marie Besse, responsable du Laboratoire, et sous la supervision de Geneviève Perréard Lopreno, anthropologue et collaboratrice scientifique.

1.2. COLLECTION INRAP GRAND EST NORD (METZ, FRANCE)

Les quatre individus échantillonnés proviennent de deux sites distincts : Sorbey et Metz-Vallières. Sur ces individus ont été réalisés de 1 à 9 prélèvements sur des os différents afin de réaliser une étude sur la variabilité intra-individuelle (Tableau 5).

Tableau 5 – Liste des individus échantillonnés à l'Inrap Grand Est nord (Metz, France)

Identifiant	Os	Sexe	Date naissance	Date de décès	Âge au décès	Conservation
Sorbey-1-1	Fémur G	M	I	1914	≈ 30	Pleine terre
Sorbey-1-3	Côte	M	I	1914	≈ 30	Pleine terre
Sorbey-1-4	Tibia G	M	I	1914	≈ 30	Pleine terre
Sorbey-1-5	Humérus G	M	I	1914	≈ 30	Pleine terre
MV-5	Fémur	I	I	XX ^e s. ap. J.-C.	I	Cercueil
MV-6-1	Fémur G	M	1900	1981	81	Cercueil
MV-6-2	Fémur D	M	1900	1981	81	Cercueil
MV-6-3	Tibia G	M	1900	1981	81	Cercueil
MV-6-4	Tibia D	M	1900	1981	81	Cercueil
MV-13-1	Fémur D	F	I	XX ^e s. ap. J.-C.	I	Cercueil
MV-13-2	Fémur G	F	I	XX ^e s. ap. J.-C.	I	Cercueil
MV-13-3	Tibia D	F	I	XX ^e s. ap. J.-C.	I	Cercueil
MV-13-4	Tibia G	F	I	XX ^e s. ap. J.-C.	I	Cercueil
MV-13-5	Humérus D	F	I	XX ^e s. ap. J.-C.	I	Cercueil
MV-13-6	Humérus G	F	I	XX ^e s. ap. J.-C.	I	Cercueil
MV-13-7	Vert Cervicale	F	I	XX ^e s. ap. J.-C.	I	Cercueil
MV-13-8	Vert Lominaire	F	I	XX ^e s. ap. J.-C.	I	Cercueil
MV-13-9	Vert Lominaire	F	I	XX ^e s. ap. J.-C.	I	Cercueil
Total n = 4 (18)						

F : femme ; M : homme ; I : donnée indéterminée ou inconnue

Le site de Sorbey (Identifiant Sorbey) correspond à un diagnostic archéologique réalisé à la suite de la découverte fortuite d'une sépulture sur une ligne forestière. Le sol dans lequel a été retrouvée la sépulture est un niveau de marnes (roche sédimentaire contenant du calcaire et de l'argile) recouvert d'une fine couche d'humus (Adam 2012b).

Le sujet a été inhumé, en décubitus, en pleine terre dans une fosse de 1,8 m de long pour 0,45 m de large, à 0,30 m de profondeur. Le comblement de la fosse est constitué d'une couche d'argile (20 cm d'épaisseur) recouverte de terre végétale (10 cm d'épaisseur). Les analyses anthropologiques ont montré qu'il s'agissait d'un sujet de sexe masculin, soldat de la Première Guerre mondiale, décédé en août 1914 dans la forêt de Sorbey qui fut le siège de combats entre le 67^e Régiment d'infanterie et les forces allemandes (Adam 2012b).

Les os de ce sujet ont fait l'objet d'un nettoyage simple (à la brosse) et sont conservés dans des sachets plastiques type Minigrip®.

Le site de Metz-Vallières (Identifiant MV) correspond à un diagnostic archéologique réalisé en vue de l'aménagement d'un lotissement sur les lieux d'un ancien cimetière tenu par les Petites

Sœurs des Pauvres. Selon les archives de cette congrégation, le terrain sur lequel a été implanté le cimetière fut acheté en 1863. Il n'existe pas de registres pour les vingt premières années de fonctionnement. De 1887 à 1999, 3827 personnes furent inhumées dans ce cimetière (Adam 2012a). Bien que le site ait été transféré au début des années 2000, de nombreuses sépultures primaires ont été mises au jour, ce niveau funéraire apparaît à un mètre de profondeur. Le sol dans lequel se situe ce niveau funéraire est caractérisé par un niveau de limon fortement argileux mêlé de pierres calcaires (40 à 50 cm d'épaisseur), surmonté d'une couche de remblai limoneux (40 à 50 cm d'épaisseur) et recouvert d'une fine couche de terre végétale (5 à 10 cm d'épaisseur) (Adam 2012a).

Il s'agit d'inhumations en cercueil, les squelettes apparaissant en décubitus dorsal. La datation des sépultures s'est faite pour deux des trois individus (MV-5 et MV-13) par la caractérisation du mobilier retrouvé associé, daté du XX^e siècle. Un sujet a pu être directement daté (MV-6) par la présence d'une plaque d'identification mentionnant son nom, ses années de naissance et de décès (Adam 2012a). Les os de ces individus ont fait l'objet d'un nettoyage simple (à la brosse) et sont conservés dans des sachets plastiques type Minigrip®.

La campagne d'échantillonnage s'est déroulée du 20 au 22 août 2012 à l'Institut National de Recherches Archéologiques Préventives du secteur Grand Est Nord, à Metz (France), après accord de Laurent Gébus, adjoint scientifique et technique de la Région Lorraine, et sous la supervision de Frédéric Adam, anthropologue et responsable des deux opérations de diagnostic.

1.3. COLLECTION DU MUSEUM NATIONAL DE PRAGUE (REPUBLIQUE TCHEQUE)

Les sujets échantillonnés au Muséum National de Prague sont des sujets ayant fait l'objet d'investigations criminelles et médico-légales afin de déterminer la cause de la mort et l'identité du défunt. À la suite de ces investigations, les os les plus pertinents quant aux investigations ont été conservés au sein du Muséum. Il s'agit le plus souvent du bloc crânio-facial, d'os longs (fémur et tibia), des os coxaux. Les os sont stockés dans des caisses en bois contreplaqué.

Préalablement à l'examen anthropologique, ces os ont été nettoyés afin de retirer les tissus mous en décomposition. Le protocole employé n'est pas bien défini et est adapté à chaque situation : le plus souvent les os sont placés dans une solution contenant de l'hypochlorite de sodium (eau de javel) et sont portés à ébullition. Le temps d'immersion et d'ébullition est variable, de l'ordre de plusieurs heures.

Lors de la réalisation des échantillons, les os présentaient encore un aspect gras au toucher associé à une couleur blanchie secondaire à l'utilisation d'hypochlorite de sodium. Ils avaient aussi une légère odeur caractéristique de ce produit (Figure 25).



Figure 25 – Photographie de l'individu PRG342/94 avant et après échantillonnage

L'os présente un aspect gras au toucher mais une couleur relativement blanchie par l'utilisation de bains d'eau de javel.

Le choix des individus prélevés s'est fait en fonction des dates de décès et nous avons essayé de couvrir des intervalles *post mortem* sur les 20 dernières années. Les âges au décès sont relativement moins importants que pour les sujets échantillonnés issus de cimetières ou de dons de corps à la science. Nous ne possédons aucune information relative à la cause du décès, ni sur les conditions de dépôt du corps préalablement à sa découverte (Tableau 6).

Tableau 6 – Liste des individus échantillonnés au Muséum National de Prague (République tchèque)

Identifiant	Os	Sexe	Date naissance	Date de décès	Âge au décès	Conservation
PRG/91	Fémur	I	I	1991	I	IML
PRG242/93	Fémur	M	1965	1993	28	IML
PRG343/94	Fémur	M	1934	1994	60	IML
PRG342/94	Fémur	M	1940	1994	54	IML
PRG596/95	Fémur	M	1945	1995	50	IML
PRG709/2001	Fémur	M	1951	2001	50	IML
PRG717/2003	Fémur	M	1955	2003	48	IML
PRG1116/2004	Fémur	M	1959	2004	45	IML
PRG827/2004	Fémur	M	1973	2004	31	IML
PRG518/2005	Fémur	M	1927	2005	78	IML
PRG567/2010	Fémur	F	1968	2010	42	IML
PRG1021/2010	Fémur	M	1962	2010	48	IML
Total n = 12						

F : femme ; M : homme ; I : donnée indéterminée ou inconnue ; IML : institut médico-légal

La campagne d'échantillonnage s'est déroulée du 11 au 16 octobre 2012 au sein du département d'Anthropologie du Muséum National d'Histoire Naturelle de Prague (République tchèque) après accord de Miluše Dobíšková et Petr Velemínský, respectivement médecin-légiste et anthropologue, et sous la supervision de Jaroslav Bruzek (Directeur de Recherches, CNRS, UMR 5199 PACEA, Université Bordeaux 1).

1.4. PRELEVEMENTS CONSERVES A L'INSTITUT DE RECHERCHE CRIMINELLE DE LA GENDARMERIE NATIONALE (ROSNY-SOUS-BOIS, FRANCE)

L'Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie Nationale conserve dans ses locaux des squelettes ayant fait l'objet d'investigations criminelles et anthropologiques. Ces os ont soit été conservés à sec (Identifiant IRCGN) soit congelés (Identifiant IRCGNc) (Tableau 7).

Tableau 7 – Liste des individus échantillonnés et conservés au sein de l'Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie Nationale (Rosny-sous-Bois, France)

Identifiant	Os	Sexe	Date naissance	Date de décès	Âge au décès	Conservation
IRCGN-01	Fémur	F	I	≈ 1995	50	Pleine terre
IRCGN-02	Fémur	I	I	1978-1980	I	Pleine terre
IRCGN-03	Fémur	I	I	1978-1980	I	Pleine terre
IRCGN-06	Fémur	I	I	≈ 1920	I	Pleine terre
IRCGN-07	Fémur	I	I	≈ 1900	I	Pleine terre
IRCGN-08	Fémur	I	I	≈ 1870	I	Pleine terre
IRCGN-12	Fémur	I	I	XI ^e s. ap. J.-C.	I	Pleine terre
IRCGN-14	Fémur	I	I	IV ^e mill. av. J.-C.	I	Pleine terre
IRCGN-15	Fémur	H	1863	1942	79	Cercueil
IRCGN-16	Fémur	H	1873	1941	68	Cercueil
IRCGN-17	Fémur	F	1898	1941	43	Cercueil
IRCGN-18	Fémur	H	1852	1941	89	Cercueil
IRCGN-19	Fémur	H	1872	1941	69	Cercueil
IRCGN-20	Fémur	F	1888	1941	53	Cercueil
IRCGN-22	Fémur	F	1864	1940	76	Cercueil
IRCGN-24	Fémur	F	1904	1939	35	Cercueil
IRCGN-25	Fémur	F	1864	1939	75	Cercueil
IRCGN-26	Fémur	F	1892	1938	46	Cercueil
IRCGN-27	Fémur	H	1866	1938	72	Cercueil
IRCGN-28	Fémur	H	1873	1938	65	Cercueil
IRCGN-29	Fémur	F	1868	1938	70	Cercueil
IRCGN-30	Fémur	F	1866	1938	72	Cercueil
IRCGN-31	Fémur	H	1853	1938	85	Cercueil
IRCGN-32	Fémur	F	1861	1937	76	Cercueil
IRCGN-33	Fémur	F	1861	1937	76	Cercueil
IRCGN-35	Fémur	H	1870	1936	66	Cercueil
IRCGN-36	Fémur	H	1860	1934	74	Cercueil
IRCGN-37	Fémur	I	I	XVII ^e	I	Pleine terre
IRCGN-38	Fémur	H	1957	1985	28	Eau douce
IRCGNc-#3/2002	Fémur	I	I	2002	I	Eau douce, congélation
IRCGNc-#4/2002	Fémur	I	I	2002	I	Eau douce, congélation
IRCGNc-#6/2003	Fémur	I	I	2003	I	Eau douce, congélation
IRCGNc-#2/2003	Fémur	I	I	2003	I	Eau douce, congélation
IRCGNc-#9/2002	Fémur	I	I	2002	I	Eau douce, congélation
Total n = 34						

F : femme ; M : homme ; I : donnée indéterminée ou inconnue

Les sujets IRCGN-01 à IRCGN-03, IRCGN-06 à IRCGN-08, IRCGN-12, IRCGN-14 et IRCGN-37 sont des individus retrouvés pour lesquels nous ne possédons que peu d'informations. Les datations carbone-14 effectuées sur IRCGN-12, IRCGN-14 et IRCGN-37 permettent d'attester de leur statut archéologique. Les datations plus approximatives sur IRCGN-

01 à IRCGN-03 et IRCGN-06 à IRCGN-08 ont été permises par l'étude du contexte associé à la découverte de ces os. Les individus IRCGN-01 à IRCGN-03, IRCGN-06 à IRCGN-08, IRCGN-12, IRCGN-14 et IRCGN-37 ont été retrouvés directement inhumés en pleine terre.

Les sujets IRCGN-15 à IRCGN-20, IRCGN-22, IRCGN-24 à IRCGN-33, IRCGN-35 et IRCGN-36 sont des sujets identifiés provenant de la réhabilitation de cimetières. Les inhumations étaient toutes à des profondeurs supérieures à un mètre, dans des caveaux. Les os ont juste été nettoyés à l'eau claire. Nous ne disposons d'aucune information permettant de caractériser le sol dans lequel étaient les caveaux.

Le sujet IRCGN-38 est un individu de sexe masculin ayant été retrouvé décédé dans sa voiture, vraisemblablement noyé. Sa voiture ainsi que le corps sont restés immergés 28 ans dans un courant d'eau douce. Le corps a été découvert en début d'année 2013.

Les sujets IRCGNc-#3/2002, IRCGNc-#4/2002, IRCGNc-#6/2003, IRCGNc-#2/2003, IRCGNc-#9/2002 sont des individus décédés par noyade ou dont le corps a été retrouvé immergé. À la suite de la découverte des corps, des fragments de fémur ont été prélevés et congelés au sein du département d'anthropologie de l'IRCGN. Ces échantillons étaient congelés en vue d'analyses ADN afin d'identifier les individus, mais aussi en vue d'analyses des diatomées retrouvées au sein de l'os afin de déterminer les conditions de la noyade ou de l'immersion du corps. Les os que nous avons analysés ont été décongelés en 2011 puis conservés à température ambiante dans des containers hermétiques au laboratoire PACEA.

Les échantillons ont été prélevés par Jean Richebé et Franck Nolot, anthropologues du département Anthropologie – Thanatologie – Odontologie après accord du Médecin en chef Yves Schuliar, Officier général du Service de Santé des Armées, sous-directeur de l'enseignement et de la recherche de l'Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie Nationale (Rosny-sous-Bois, France). Ces échantillons nous ont ensuite été envoyés au Laboratoire PACEA.

1.5. PRELEVEMENTS REALISES A L'ÉCOLE DE CHIRURGIE DE PARIS (FRANCE)

L'École de Chirurgie de l'Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (ou École de Chirurgie de Paris) offre aux praticiens hospitaliers ou autres chercheurs la possibilité de mener des travaux expérimentaux dans beaucoup de discipline. Elle dispose d'un plateau technique important et met à disposition aussi bien des rongeurs et gros animaux, que des sujets anatomiques humains.

Dans ce cadre, nous avons pu effectuer des prélèvements sur des sujets anatomiques récents. Les dates de décès des quatre individus échantillonnés étaient toutes comprises dans les 15 jours

précédant notre visite. Le mode de conservation des sujets depuis leur décès était exclusivement la réfrigération ; aucun autre traitement conservateur n'a été employé (Tableau 8).

Tableau 8 – Liste des individus échantillonnés à l'École de Chirurgie (Paris, France)

Identifiant	Os	Sexe	Date naissance	Date de décès	Âge au décès	Conservation
EC12-2502	Fémur	F	1923	2012	89	Réfrigération
EC12-2693	Fémur	F	1940	2012	72	Réfrigération
EC12-2673	Fémur	M	1927	2012	85	Réfrigération
EC12-2652	Fémur	M	1948	2012	64	Réfrigération
Total n = 4						

F : femme ; M : homme

La campagne d'échantillonnage s'est effectuée le 10 mai 2012 à l'École de chirurgie de Paris après accord du Pr Pascal Frileux et sous la supervision de Djamel Taleb, cadre supérieur de santé, en présence du Dr Yves Schuliar.

1.6. COLLECTIONS DU LABORATOIRE D'ANATOMIE DE L'UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES ET DE L'INSTITUT ROYAL DES SCIENCES NATURELLES DE BELGIQUE (BRUXELLES, BELGIQUE)

Les sujets échantillonnés à Bruxelles proviennent de trois contextes distincts : un soldat de la Première Guerre mondiale, trois sujets issus de cimetières et 16 sujets anatomiques (Tableau 9).

Tableau 9 – Liste des individus échantillonnés au Laboratoire d'Anatomie de l'Université Libre de Bruxelles et de la collection Châtelet (Bruxelles, Belgique)

Identifiant	Os	Sexe	Date naissance	Date de décès	Âge au décès	Conservation
BRUCHAT-2	Fémur G	M	1860	1920	60	Cercueil
BRUCHAT-4	Fémur D	F	1877	1963	86	Cercueil
BRUCHAT-13	Fémur D	F	1873	1942	69	Cercueil
BRUMANAGE	Fémur D	M	I	1917	≈ 20	Pleine terre
BRUULB-1	Fémur G	F	28/03/41	04/06/2012	71	IML
BRUULB-2	Fémur G	F	04/03/14	01/06/2012	98	IML
BRUULB-3	Fémur G	M	12/12/20	28/03/2012	91	IML
BRUULB-4	Fémur D	M	27/07/40	28/01/2012	71	IML
BRUULB-5	Fémur D	F	06/11/45	01/02/2012	66	IML
BRUULB-6	Fémur D	F	02/04/17	29/01/2012	94	IML
BRUULB-8	Fémur G	F	19/11/26	16/04/2012	85	IML
BRUULB-9	Fémur D	F	28/01/11	07/03/2012	101	IML
BRUULB-10	Fémur D	F	19/11/16	16/02/2012	95	IML
BRUULB-11	Fémur G	M	07/02/21	06/04/2012	91	IML
BRUULB-12	Fémur G	F	13/04/35	04/01/2012	76	IML
BRUULB-14	Fémur G	M	16/10/19	11/03/2012	92	IML
BRUULB-18	Fémur D	F	25/09/40	20/12/2011	71	IML
BRUULB-19	Fémur D	F	24/11/32	04/06/2012	79	IML
BRUULB-20	Fémur D	M	30/01/26	21/01/2012	85	IML
BRUULB-44	Fémur G	M	21/10/19	25/01/2012	92	IML
Total n = 20						

F : femme ; M : homme ; I : donnée indéterminée ou inconnue ; IML : institut médico-légal

Le soldat de la Première Guerre mondiale (Identifiant BRUMANAGE) est issu d'un lot d'os provenant de trois individus retrouvés chez un particulier, en Belgique. Le sujet le plus complet a pu faire l'objet d'une étude anthropologique qui a permis de déterminer qu'il s'agissait d'un individu masculin âgé d'une vingtaine d'années. Le particulier chez qui les os ont été découverts a indiqué avoir lui-même fouillé les sépultures, en France, au lieu-dit Chemin des Dames (Beauthier *et al.* 2010).

Les sujets issus de la collection Châtelet (Identifiant BRUCHAT) sont des sujets exhumés d'un cimetière. La collection est en cours de constitution et comprend à ce jour 13 individus nés à la fin du XVIII^e siècle ou au XIX^e siècle, les dates de décès s'échelonnent de 1870 à 1963. Seuls trois individus ont été échantillonnés, correspondant aux trois sujets dont les dates de décès sont les plus récentes. Les sujets BRUCHAT-2 et BRUCHAT-13 étaient inhumés dans des cercueils au sein de caveaux alors que le sujet BRUCHAT-4 était inhumé en cercueil directement en pleine terre dans un milieu où le battement de la nappe phréatique était important. Ces trois sujets ont fait l'objet d'un nettoyage plus ou moins important avec du Dettol®, produit nettoyant composé de chloroxylénol (C₈H₉ClO), d'huile de pin, d'isopropanol (C₃H₈O), d'huile de ricin, de caramel et d'eau. Les os étaient laissés immergés dans une solution de Dettol® diluée à une température de 40 à 60 °C pendant plusieurs heures. La durée d'immersion dans cette solution variait en fonction de la présence résiduelle de tissus mous sur les os.

Les sujets provenant de l'Université Libre de Bruxelles, sont des corps donnés à la science utilisés à des fins d'enseignement pour les étudiants en médecine et odontologie. Lorsque le corps arrive dans l'Unité de Médecine Légale, il fait l'objet d'un traitement de conservation par injection intravasculaire et immersion dans une solution d'embaumement. Cette solution est composée d'eau (H₂O), d'éthanol (C₂H₆O), de formol (CH₂O), de phénol (C₆H₆O), de glycérine (C₃H₈O₃), d'hydrate de chloral (C₂H₃Cl₃O₂), de sulfate de sodium (Na₂SO₄), de sulfate de magnésium (MgSO₄) et de nitrate de potassium (KNO₃) (Van Sint Jan et Rooze 1992).

La campagne d'échantillonnage s'est déroulée du 02 au 05 avril 2013. Tout d'abord au sein de l'Unité d'anthropologie biologique de l'Institut royal des Sciences naturelles de Belgique (Bruxelles, Belgique) pour les échantillons de la collection Châtelet et le soldat de la Première Guerre mondiale après accord de Patrick Sémal, anthropologue et responsable des collections, et sous la supervision de Caroline Polet, anthropologue. Ensuite, la campagne d'échantillonnage s'est poursuivie à l'Unité de médecine légale de l'Université Libre de Bruxelles (Belgique) après accord du Pr Marcel Rooze, directeur du laboratoire d'anatomie, et du Dr Jean-Pol Beauthier, médecin légiste, et sous la supervision du Dr Philippe Lefèvre, anthropologue.

1.7. COLLECTION DE MILAN (ITALIE)

La collection ostéologique de Milan est une collection en cours de constitution rassemblant plusieurs dizaines de squelettes provenant d'un cimetière de Milan. Les sujets ont été inhumés dans des cercueils directement en pleine terre et n'ont fait l'objet d'aucun traitement de conservation initial (embaumement). Nous avons pu échantillonner 15 sujets de cette collection (Identifiant MIL) ainsi qu'un sujet décédé en 2013 (MIL-L1F) conservé au sein de l'Institut Médico-Légal de Milan.

Tableau 10 – Liste des individus échantillonnés de la Collection Milan (Italie)

Identifiant	Os	Sexe	Date naissance	Date de décès	Âge au décès	Conservation
MIL-19-L4R	Fémur	F	1900	17/12/1990	90	Cercueil
MIL-33-L5R	Fémur	M	1907	04/04/1991	84	Cercueil
MIL-39-L6R	Fémur	M	1915	09/03/1991	76	Cercueil
MIL-55-L9R	Fémur	M	1908	04/02/1991	83	Cercueil
MIL-62-L8R	Fémur	F	1918	14/02/1991	73	Cercueil
MIL-1	Fémur	M	1906	31/05/1991	85	Cercueil
MIL-9	Fémur	F	1921	07/03/1991	70	Cercueil
MIL-12	Fémur	M	1918	14/03/1991	73	Cercueil
MIL-15	Fémur	M	1909	15/07/1991	82	Cercueil
MIL-56	Fémur	F	1908	02/01/1991	83	Cercueil
MIL-41	Fémur	M	1931	05/06/1991	60	Cercueil
MIL-47	Fémur	F	1915	26/05/1991	76	Cercueil
MIL-70	Fémur	F	1903	22/12/1990	87	Cercueil
MIL-85	Fémur	F	1909	04/07/1991	82	Cercueil
MIL-94	Fémur	F	1894	04/03/1991	97	Cercueil
MIL-L1F	Fémur	M	1941	01/02/2013	72	IML
Total n = 16						

F : femme ; M : homme ; IML : institut médico-légal

Les échantillons de la Collection de Milan n'ont pas fait l'objet d'une campagne de prélèvement de notre part. Les échantillons ont été prélevés et conditionnés dans des sachets plastiques de type Minigrip® (Figure 26) par Alberto Amadasi, post-doctorant au sein du département de morphologie humaine du Laboratoire d'anthropologie et odontologie médico-légale (LABANOF) de l'Université de Milan (Italie), après accord du Pr Cristina Cattaneo, médecin légiste et responsable de ce laboratoire. Les prélèvements ont ensuite été envoyés par voie postale au laboratoire PACEA.



Figure 26 – Prélèvement réalisé sur un os de la collection Milan

(Photo A. Amadasi, LABANOF, Université de Milan, Italie)

1.8. OS D'INTERET ARCHEOLOGIQUE

Les échantillons d'intérêt archéologique proviennent de quatre collections distinctes. Quatre sujets proviennent de la collection de l'IRCGN (IRCGN-08, IRCGN-12, IRCGN-14 et IRCGN-37) et les trois autres collections ne sont représentées que par un seul sujet par collection.

Tableau 11 – Liste des individus d'intérêt archéologique (République tchèque, Italie et France)

Identifiant	Os	Sexe	Datation	Conservation
IRCGN-08	Fémur	I	≈ 1870	Pleine terre
IRCGN-12	Fémur	I	XI ^e s. ap. J.-C.	Pleine terre
IRCGN-14	Fémur	I	IV ^e mill. av. J.-C.	Pleine terre
IRCGN-37	Fémur	I	XVII ^e	Pleine terre
SB3	Fémur	I	1742	Pleine terre
SSPM3	Mandibule	I	I ^{er} -III ^e s. ap. J.-C.	Catacombe
LYON-03	Fémur	I	60-70 ap. J.-C.	pleine terre
Total n = 7				

I : donnée indéterminée ou inconnue

L'échantillon SB3 provient du cimetière Saint-Benoît (Prague, République tchèque) et est daté de 1742 durant le Siège de Prague pendant la Guerre de succession d'Autriche (Salesse *et al.* 2013). La sépulture correspond à une inhumation en pleine terre.

L'échantillon SSPM3 provient de la catacombe des Saints Pierre et Marcelin (Rome, Italie) datée des I^{er} au III^e siècles de notre ère. Cette catacombe a fonctionné comme sépulture multiple avec des milliers d'individus inhumés dans un même endroit.

L'échantillon Lyon-03 provient de fouilles archéologiques menées par le Service Régional de l'Archéologie de la ville de Lyon. Les sépultures sont datées grâce au mobilier qui leur est associé (céramique) et il s'agit de sépulture individuelle en pleine terre.

Les os de ces individus ont fait l'objet d'un nettoyage simple (à la brosse) et sont conservés dans des sachets plastiques type Minigrip®.

Les prélèvements nous ont directement été transmis au laboratoire.

2. OS EXPERIMENTAUX : *SUS SCROFA*

Nous avons réalisé une étude expérimentale sur des os de cochons (*Sus scrofa*) car il a été montré par plusieurs auteurs que cet animal était un modèle analogue pour le corps humain grâce aux similitudes de composition de leur tissu osseux et à leur masse qui est proche de la nôtre (Aerssens *et al.* 1998 ; Forbes *et al.* 2005a).

Les os utilisés sont des fragments de fémurs de cochons domestiques obtenus après abattage auprès des abattoirs de Bordeaux, au Marché d'Intérêt National de Brienne (Bordeaux, France). Ces fragments sont décharnés et mesurent environ 10 cm de longueur pour un poids compris entre 450 et 550 g.

La phase expérimentale s'est déroulée sur une période de trois ans, de mai 2011 à mai 2013, dans la commune de Saint-Avit (Landes, France). Le sol de cette zone géographique est sablonneux (sable quartzeux fin) et repose sur un plateau sédimentaire. Il est recouvert de terre végétale sur une épaisseur d'environ 10 cm.

La première année, en mai 2011, nous avons procédé à l'enterrement de deux fragments d'os de cochons à une profondeur de 30 cm et en les séparant d'une distance de un mètre. Au cours de cette mission, nous avons également laissé un fragment à l'air libre posé sur le même substrat protégé des prédateurs par un grillage à maille large n'empêchant ni l'activité des insectes ni l'action des éléments.

La seconde année, en mai 2012, nous avons prélevé un des deux os enterrés. Nous avons aussi réalisé deux prélèvements sur l'os laissé à l'air libre : un prélèvement sur sa face supérieure, exposée au soleil, et un prélèvement sur sa face inférieure, en contact avec le sol. Cet os a ensuite été remis en place dans les mêmes conditions qu'indiquées précédemment.

Enfin la troisième année, en mai 2013, nous avons déterré le deuxième os et nous avons à nouveau réalisés deux prélèvements sur l'os laissé à l'air libre : un au niveau de sa face supérieure et un au niveau de sa face inférieure.

Nous avons donc un corpus de 7 échantillons d'os de cochon (Tableau 12).

Tableau 12 – Liste des échantillons expérimentaux

Identifiant	Datation	Conservation
VAL12-11-22	0	Frais
SAterre12	1	Pleine terre
SAairsol12	1	Air libre, surface inférieure
SAairair12	1	Air libre, surface supérieure
SAterre13	2	Pleine terre
SAairsol13	2	Air libre, surface inférieure
SAairair13	2	Air libre, surface supérieure
Total n = 7		

3. MATERIELS ET PRODUITS CONSOMMABLES

Après le prélèvement de l'échantillon osseux ou après sa réception, si le prélèvement n'a pas été fait par nos soins, différents protocoles ont été mis en place afin de préparer l'échantillon en vue de son analyse RMN. Au cours de ces différents protocoles, nous avons utilisé des produits chimiques, que ce soit lors des phases de nettoyage du matériel entre deux acquisitions RMN ou que ce soit des produits qui ont eux-mêmes fait l'objet d'acquisitions RMN.

Pour le nettoyage et le rinçage de nos instruments, nous avons utilisé de l'éthanol (à 96 % de chez Sigma Aldrich®, Saint-Louis, MO, USA) et de l'eau ultrapure produite par le système Milli-Q® Reference du laboratoire Merck Millipore (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

Au cours de la préparation de nos échantillons (broyage) en vue de leurs analyses, nous avons utilisé de l'azote liquide (Air Liquide™, Paris, France). Puis, pour nos acquisitions en RMN des solides, nous avons utilisés trois standards de référence : le « Lineshape – 3 % Chloroform » qui contient 3 % de chloroforme dans de l'acétone-d₆ (Bruker, Wissembourg, France) ; de la glycine cristalline contenue dans le coffret « L-Amino acids » (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO-USA) ; et de l'acide phosphorique H₃PO₄ à 85 % du volume. Au cours de nos acquisitions en RMN des liquides, nous avons utilisé comme solvant de l'eau deutérée ²H₂O encore appelée D₂O avec 99,9 % de deutérium ²H (Euriso Top, Saint-Aubin, France).

Le stockage et le conditionnement de nos échantillons, suivant les différentes étapes du prélèvement à l'analyse, ont été fait dans des sachets plastiques Minigrip®, des piluliers en verre et des microtubes Eppendorf® (Eppendorf, Hambourg, Allemagne).

Chapitre 4.2

Préparation des échantillons osseux et séquences d'acquisition en RMN

L'étape de préparation des échantillons que ce soit en termes de prélèvement ou de nettoyage est très importante avant toute analyse. Une bonne maîtrise de cette étape permet de diminuer les biais qui pourraient fausser notre interprétation des résultats. Une attention particulière a donc été portée à cette étape que nous allons détailler. Nous décrirons aussi les séquences que nous utiliserons en spectroscopie RMN des liquides et des solides.

1. PROTOCOLE DE PRELEVEMENTS

Les protocoles de prélèvements des échantillons osseux utilisés ont été définis en fonction de la nature de la collection anatomique étudiée c'est-à-dire de la présence de tissus mous ou non sur les os. Pour certaines collections, les échantillons ont été prélevés sur place par un opérateur local sans nécessité de déplacement de notre part.

Les prélèvements ont été effectués sur la diaphyse des os longs – essentiellement du fémur – et sur certains os courts (vertèbres). Le choix s'est porté sur le fémur car c'est l'os qui présente la corticale osseuse la plus épaisse le préservant le mieux des contaminations extérieures ; de plus, c'est l'os qui est le plus souvent retrouvé et identifié en contexte médico-légal (Lambert *et al.* 1982 ; Galloway *et al.* 1997 ; Forbes 2004 ; Janjua et Rogers 2008).

1.1. PRELEVEMENTS

1.1.1. Protocole pour des prélèvements sur os secs

Ce protocole concerne les sujets de la collection Simon (Genève, Suisse), les sujets provenant de l'Inrap Grand Est nord (Metz, France), les individus de la collection du Muséum National de Prague (Prague, République tchèque), les sujets provenant de l'Institut royal des Sciences naturelles de Belgique (Bruxelles, Belgique) et les échantillons de faune (*Sus scrofa*).

L'échantillonnage a été réalisé à l'aide d'une fraise trépan diamantée (Profibohrer GmbH, Lunen, Allemagne) (Figure 27) montée sur une perceuse sans fil.

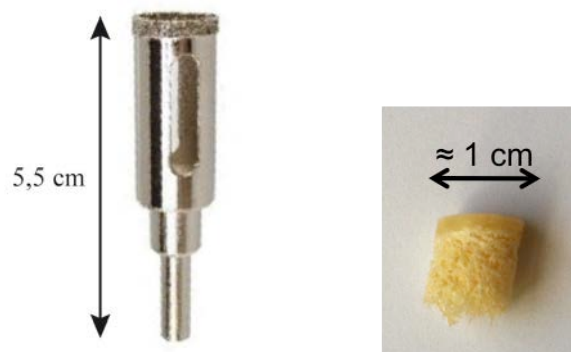


Figure 27 – Exemple d'un trépan diamanté et de l'échantillon osseux obtenu

Le revêtement diamanté du trépan présente de nombreux avantages : (1) il évite les phénomènes de torsion de la pièce échantillonnée et donc les risques de fracture par opposition à un trépan présentant une denture ; (2) il a un pouvoir de coupe très important ce qui diminue le temps nécessaire à la réalisation de l'échantillonnage et donc la chauffe de la pièce ; et (3) la dureté du revêtement fait qu'il ne contamine pas l'échantillon.

Le choix du diamètre du trépan (de 12 à 16 mm pour notre étude) se fait en fonction de l'épaisseur et du type d'os échantillonné. Les diamètres les plus importants sont réservés pour les os présentant une corticale peu épaisse (humérus par exemple). Les échantillons obtenus pèsent donc entre 500 mg et 1,5 g avant nettoyage mécanique (*vide infra*).

Les échantillons prélevés sont ensuite placés dans des sachets en plastique Minigrip® puis sont identifiés.

1.1.2. Protocole pour des prélèvements sur cadavre

Ce protocole concerne les sujets échantillonnés à l'École de Chirurgie (Paris, France) et au Laboratoire d'Anatomie de l'Université Libre de Bruxelles (Bruxelles, Belgique).

Le protocole diffère pour les phases initiales de prélèvement du fait de la présence de tissus mous sur les os. La première étape consiste donc à créer un accès à l'os sous-jacent par dissection des tissus le recouvrant (derme, tissu adipeux et tissu musculaire). Cette dissection est réalisée à l'aide d'un bistouri et les tissus sont réclinés latéralement grâce à des pinces à griffes. L'accès à l'os se fait après élimination du périoste superficiel avec une rugine (instrument chirurgical permettant la séparation entre le périoste et l'os sous-jacent). L'École de Chirurgie et le Laboratoire d'Anatomie de l'Université Libre de Bruxelles étant dotés d'un plateau technique important, les prélèvements osseux ont été réalisés avec des scies chirurgicales (oscillante ou rotative). Les échantillons obtenus pèsent de 2 à 5 g avant nettoyage mécanique.

Les échantillons prélevés sont ensuite placés dans des sachets en plastique Minigrip® puis sont répertoriés.

1.1.3. Os déjà échantillonnés

Ce protocole concerne les échantillons provenant de l'Institut de Recherche Criminelle de la Gendarmerie Nationale (Rosny-sous-Bois, France), de l'Université de Milan (Milan, Italie) et les échantillons archéologiques. Ces échantillons, non prélevés par nos soins, ont seulement fait l'objet d'un nettoyage mécanique.

1.2. NETTOYAGE MECANIQUE

Un nettoyage mécanique a été effectué sur les surfaces externe et interne de l'os avec une fraise diamantée ou en carbure de tungstène montée sur une mini-perceuse de type Dremel® 300 Series allant de 10 000 à 33 000 tr/min. Sur la surface externe, ce nettoyage a pour but de retirer une éventuelle contamination de la couche superficielle de l'os qui se concentre sur les premiers 0,5 mm (Lambert *et al.* 1989). Au niveau interne, en plus de la contamination, le nettoyage retire le tissu trabéculaire résiduel. Certains auteurs (Piepenbrink 1989) préconisent d'adapter les protocoles de nettoyage en fonction des conditions de décomposition post dépositionnelles des os.

1.3. CONDITIONNEMENT

Une fois prélevé et nettoyé, chaque échantillon, si son volume est important, est découpé en fragments d'environ 0,5 – 1 g. Ces fragments sont ensuite placés dans des piluliers en verre puis identifiés.

2. PROTOCOLE DE BROUAGE

Le broyage a été effectué avec un vibro-broyeur MM 400 de la marque Retsch® (Retsch GmbH, Haan, Allemagne) (Figure 28). Ce broyeur fonctionne par impact et friction, et permet l'obtention d'une poudre fine et homogène en quelques dizaines de secondes. La granulométrie obtenue est de l'ordre de 5 µm.



Figure 28 – Broyeur MM 400 et bol de 10 ml en carbure de tungstène (Retsch®)

(Photos : www.retsch-fr.com)

Nous avons utilisé un bol de 10 ml avec des billes de diamètre 12 ou 15 mm, le tout en carbure de tungstène. Ce matériau a l'avantage de présenter une forte densité ce qui lui confère une énergie cinétique lors du broyage plus importante, diminuant ainsi le temps nécessaire pour l'obtention d'une poudre homogène. De plus, ce matériau extrêmement dur ne contamine pas l'échantillon et n'interfère donc pas avec les analyses de spectroscopie RMN qui seront menées ultérieurement.

Avant le broyage, l'échantillon ainsi qu'une bille de 15 mm de diamètre ou deux billes de 12 mm de diamètre sont immergés pendant quelques minutes dans de l'azote liquide (77 kelvins) afin de congeler l'échantillon ce qui le rend plus cassant et permet de limiter les phénomènes de chauffe dus au broyage. Le cycle de broyage dure 30 secondes à une fréquence de 30 Hz (oscillations par seconde). La poudre ainsi obtenue est placée dans un microtube Eppendorf® (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) à température ambiante et est identifié.

3. PREPARATION DES ECHANTILLONS EN VUE DES ANALYSES DE SPECTROSCOPIE RMN

3.1. EN SPECTROSCOPIE RMN DES SOLIDES

3.1.1. Le contenant : Rotor

Les échantillons en poudre sont placés dans des rotors (contenant spécifique permettant les analyses de spectroscopie de RMN des solides) (Figure 29).

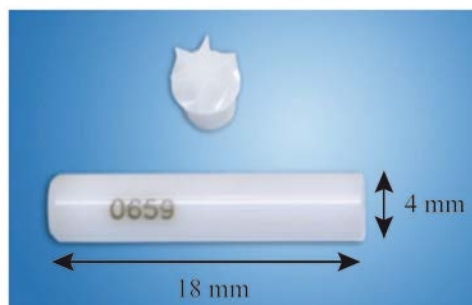


Figure 29 – Rotor et bouchon MAS de 4 mm de diamètre

(Photo : www.store.bruker-biospin.com)

Pour nos analyses nous utilisons un rotor adapté à la rotation à l’angle magique (MAS). Le rotor fait 4 mm de diamètre pour une contenance de 80 μ l. Le rotor est en oxyde de zirconie (ZrO_2), matériau présentant une grande dureté et n’interférant pas avec les analyses RMN, le bouchon est quant à lui en polychlorotrifluoroéthylène (PCTFE) ou Kel-F® (Cortec Corporation, Saint Paul, MN, USA).

3.1.2. Pesée

Selon la quantité de poudre disponible par échantillon et sa granulométrie, la quantité analysée représente entre 90 et 140 mg d’os. La pesée s’effectue avec une balance de précision XS105 DualRange (Mettler Toledo©, Columbus, OH, USA) au $1/10^e$ de mg.

3.1.3. Lyophilisation

Chaque échantillon possède intrinsèquement une quantité d’eau non négligeable, qu’elle soit adsorbée ou faisant partie intégrante de la matrice cristalline. Cette eau représente environ 10 % du poids d’un os frais (LeGeros 1981, 1991 ; Olszta *et al.* 2007), et est présente en quantité variable sur les os médico-légaux ou archéologiques en fonction des conditions de conservation. Afin de déterminer la teneur en eau des poudres d’os, une partie de l’échantillon a été lyophilisée. Le rapport massique avant et après lyophilisation nous permet de déterminer quelle est la proportion d’eau adsorbée de l’échantillon :

$$Teneur_{eau} = 1 - \frac{m_{lyoph}}{m_{initiale}} \quad [9]$$

La lyophilisation (dessiccation par sublimation) s’est faite après congélation de l’échantillon dans de l’azote liquide et passage au lyophilisateur pendant 12 à 24 heures.

3.1.4. Base de données

Les résultats concernant les pesées et les teneurs en eau adsorbée ont été intégrés dans une base de données Microsoft® Excel permettant le calcul de différentes données :

- La masse sèche analysée par spectroscopie RMN : elle correspond à la masse non lyophilisée insérée dans le rotor multipliée par le rapport entre la masse avant et après lyophilisation.

————— [10]

- Un facteur correctif pour 100 mg : ce facteur permet de rapporter la masse réellement analysée à une masse théorique sèche (lyophilisée) de 100 mg.

————— [11]

Appliqué aux aires et aux intensités spectrales, ce facteur autorise la comparaison entre tous les spectres obtenus par RMN du carbone-13 et RMN du proton, indépendamment de leur teneur en eau, et de la masse initiale analysée.

3.1.5. Cas particulier de l'analyse d'un échantillon de Minigrip®

Afin d'identifier une éventuelle contamination des échantillons par le sachet Minigrip® dans lequel ils ont été stockés, nous en avons réalisé une analyse en RMN des solides du carbone-13 et du proton.

3.2. EN SPECTROSCOPIE RMN DES LIQUIDES

Les échantillons utilisés en RMN des liquides sont des échantillons de référence analysés afin de mettre en évidence leur éventuelle présence dans les échantillons osseux en cas de contamination.

Il s'agit de la solution d'embaumement utilisée au laboratoire d'anatomie de l'Université Libre de Bruxelles (Belgique) et du liquide nettoyant étant utilisé pour nettoyer les os de la collection Châtelet (Bruxelles, Belgique).

La solution d'embaumement est composée d'eau (H_2O), d'éthanol (C_2H_6O), de formol (CH_2O), de phénol (C_6H_6O), de glycérine ($C_3H_8O_3$), d'hydrate de chloral ($C_2H_3Cl_3O_2$), de sulfate de sodium (Na_2SO_4), de sulfate de magnésium ($MgSO_4$) et de nitrate de potassium (KNO_3) (Van Sint Jan et Rooze 1992).

Le liquide nettoyant correspond à du Dettol®, produit composé de chloroxylénol (C_8H_9ClO), d'huile de pin, d'isopropanol (C_3H_8O), d'huile de ricin, de caramel et d'eau.

4. SPECTROMETRE RMN ET SEQUENCES D'ACQUISITION

4.1. LES SPECTROMETRES

Les acquisitions en RMN des solides ont été réalisées sur un spectromètre Bruker Avance II 500 MHz (Bruker, Wissembourg, France) équipé d'un aimant WB (Wide Bore) Ultrashield et d'une sonde de type DVT, CP-MAS $^1H/X$ bas-gamma de 4 mm. La fréquence de résonance du proton est à 500,16 MHz, celle du carbone-13 à 125,76 MHz et celle du phosphore-31 à 202,34 MHz.

Les acquisitions de spectroscopie de RMN des liquides ont été réalisées sur un spectromètre Bruker Avance 400 (Bruker, Wissembourg, France) équipé d'un aimant SB (Standard Bore) Ultrashield et d'une sonde de type QNP (Quattro Nucleus Probe) $^1H/^{19}F-^{31}P-^{13}C/Lock$ avec gradient Z. La fréquence de résonance du proton est à 400,13 MHz et celle du carbone-13 à 100,62 MHz.

Les données sont ensuite traitées informatiquement avec le logiciel TopSpin™ 2.1 sur la station de travail propre au spectromètre ou avec le logiciel TopSpin™ 3.1 (licence étudiante) sur mon ordinateur personnel.

La plateforme RMN se situe à l'Institut Européen de Chimie et de Biologie (IECB, UMS 3033) à Pessac (France) et le travail s'est effectué au sein de l'équipe de Chimie et Biologie des Membranes et Nano-objets (CBMN, UMR 5248) dirigée par Erick J. Dufourc.

4.2. LES SEQUENCES D'ACQUISITION EN RMN DES SOLIDES

4.2.1. RMN du proton

La séquence d'acquisition pour les spectres proton est simple et correspond à impulsion à 90° , suivie de l'acquisition, puis d'un délai de retour à l'équilibre (D_1) (Figure 30). Les acquisitions sont réalisées avant et après lyophilisation de l'échantillon.

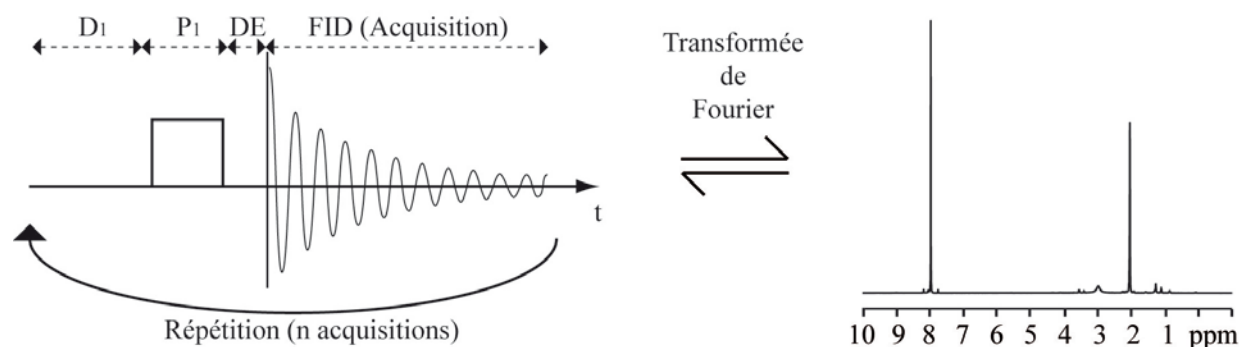


Figure 30 – Séquence d'acquisition en RMN du proton

D_1 : délai entre deux acquisitions (s) ; P_1 : durée de l'impulsion (μ s) ; DE : temps mort entre l'impulsion et l'acquisition (μ s) ; FID : acquisition (ms)

Pour les échantillons osseux, nous avons réalisé 8 acquisitions avec un délai D_1 de 5 s (le choix du délai D_1 a fait l'objet d'une optimisation, cf. partie 5, chapitre 5.1, page 193) et une impulsion P_1 de 4,5 μ s. Cela correspond à un temps d'acquisition total de 41 s.

Pour l'analyse du Minigrip®, nous avons réalisé 16 acquisitions avec un délai D_1 de 5 s et une impulsion P_1 de 4,5 μ s. Cela correspond à un temps d'acquisition total de 1 min 22 s.

La RMN du proton est une expérience quantitative si l'on se place dans des conditions où l'aimantation retourne en totalité à l'équilibre avant l'application d'une nouvelle séquence de mesure). En effet, l'intensité et l'aire de chaque pic sont directement proportionnelles à la quantité d'atomes d'hydrogène contenus dans l'échantillon analysé (cf. Équation [5] page 109).

Pour notre étude, nous avons utilisé une référence externe afin de ne pas altérer la composition de nos échantillons initiaux. En effet, les références internes doivent être mélangées avec l'échantillon ce qui rend la récupération de l'échantillon ou de la référence impossible. De plus, il y a un risque potentiel de réaction chimique entre l'échantillon et la référence. Cependant, utiliser une référence externe implique la réalisation de l'acquisition RMN de l'échantillon dans un temps différent de celui de la référence ; on considère donc que la sensibilité du spectromètre est stable sur la période de temps couvrant les deux acquisitions (référence et échantillon).

Pour les acquisitions proton, nous avons donc choisi une référence de 3 % de chloroforme CHCl_3 dans de l'acétone- d_6 $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$. Les protons de l'acétone résonnent à 2,05 ppm et celui du chloroforme à 8,02 ppm (Gottlieb *et al.* 1997 ; Pretsch *et al.* 2000 ; Fulmer *et al.* 2010).

4.2.2. RMN du carbone-13

La séquence d'acquisition pour les spectres carbone est plus complexe car les atomes de carbone-13 sont peu abondants (rappelons qu'ils représentent seulement 1,1 % de tous les atomes de carbone en présence). De ce fait, afin d'augmenter le rapport signal/bruit, nous avons choisi une séquence CPMAS (Cross Polarization at Magic Angle Spinning) à 10 kHz, qui correspond à un transfert de polarisation des protons vers les atomes de carbone associé à un découplage des protons durant l'acquisition alors que l'échantillon tourne à 10 000 tours par seconde sur lui-même (Perry *et al.* 2002 ; Mroue *et al.* 2012). Cela permet aux atomes de carbone d'apparaître sous la forme de pics relativement fins (Figure 31).

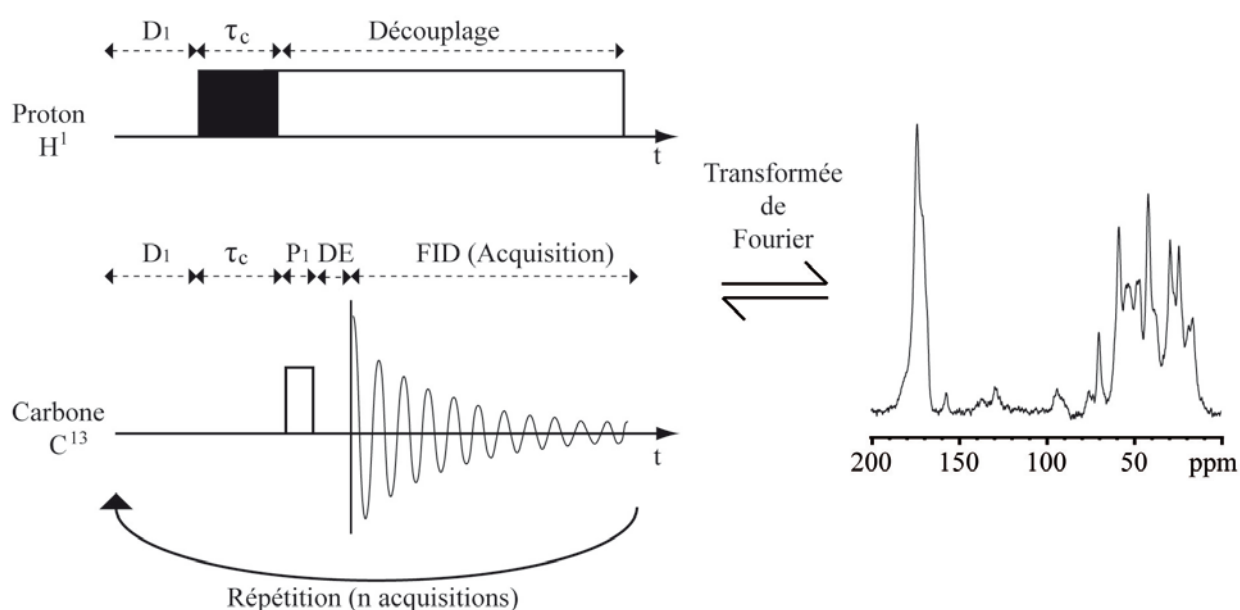


Figure 31 – Séquence d'acquisition en RMN du carbone-13

D_1 : délai entre deux acquisitions (s) ; τ_c : temps de contact (ms) ; P_1 : durée de l'impulsion (μ s) ; DE : temps mort entre l'impulsion et l'acquisition (μ s) ; FID : acquisition (ms)

Les paramètres retenus sont un nombre d'acquisitions de 10 240, avec un délai D_1 de 5 s, un temps de contact de 1,5 ms (le choix du temps de contact a fait l'objet d'une optimisation, cf. partie 5, chapitre 5.1, page 193) et une durée d'impulsion P_1 de 2,85 μ s.

Concernant l'échantillon de Minigrip®, nous avons également utilisé une séquence CPMAS à 10 kHz avec une accumulation de 4 096 acquisitions, un délai D_1 de 5 s, un temps de contact de 1,5 ms et une durée d'impulsion P_1 de 2,85 μ s.

La RMN du carbone-13 n'est pas une expérience quantitative au sens strict du terme. En effet, l'intensité et l'aire de chaque pic sont déterminées par la qualité du transfert de polarisation

qui est elle-même dépendante du nombre d'atomes d'hydrogène liés directement ou indirectement à l'atome de carbone observé dans l'échantillon. L'utilisation de conditions d'analyses strictement identiques quel que soit l'échantillon permet, néanmoins, d'avoir une idée de la quantité relative de chaque composé au sein de l'échantillon et autorise la comparaison de différents échantillons entre eux.

Les spectres en RMN des solides du carbone-13 sont calibrés grâce à l'utilisation d'un échantillon de référence externe pour les mêmes raisons qu'en RMN du proton. En RMN des solides du carbone-13, la glycine ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) est une référence standard idéale car elle présente un coût peu élevé, est stable et fournit un spectre RMN simple (deux pics). Les spectres sont donc référencés par rapport au groupement carboxyle COOH de la glycine cristalline qui résonne à 176,03 ppm (Saito et Yokoi 1992).

4.2.3. RMN du phosphore-31

Les atomes de phosphore-31 sont peu abondants au sein du tissu osseux donc, afin de faciliter leur détection, nous avons utilisé le même type de séquence qu'en RMN du carbone-13. Nous avons alors choisi une séquence CPMAS à 8 kHz permettant l'obtention d'un seul pic par atome de phosphore-31 (Kaflak-Hachulska *et al.* 2003 ; Kolodziejski 2004 ; Kaflak *et al.* 2006).

Les paramètres retenus sont un nombre de 26 acquisitions, avec un délai D_1 de 5 s, un temps de contact τ_c de 6,1 ms et une durée d'impulsion P_1 de 2,85 μs . Les déplacements chimiques ont été calibrés par rapport à de l'acide phosphorique H_3PO_4 à 85 % dont la résonance se situe à 0 ppm (Roufosse *et al.* 1984).

4.3. LES SEQUENCES D'ACQUISITION EN RMN DES LIQUIDES

4.3.1. RMN du proton

En RMN du proton des liquides, du fait de la forte proportion d'eau dans l'échantillon, il est nécessaire d'utiliser des séquences spéciales qui suppriment le signal de l'eau. Nous avons donc utilisé deux séquences différentes :

- Une séquence dite de « présaturation » qui permet d'irradier tous les protons contenus dans l'eau mais aussi ceux des molécules qui interagissent avec l'eau. Le signal de ces protons est donc fortement inhibé. On réalise alors une accumulation de 64 acquisitions, avec un délai D_1 de 5 s et une impulsion $90^\circ P_1$ de 13 μs ;

- Une séquence appelée « Watergate » où l'irradiation concerne uniquement le signal de l'eau (Liu *et al.* 1998). On accumule alors 64 acquisitions, avec un délai D_1 de 5 s et une impulsion $90^\circ P_1$ de 13 μ s.

Le solvant utilisé en RMN des liquides du proton est l'eau deutérée D_2O . Les spectres ont été référencés par rapport au déplacement chimique de l'eau dans ce solvant qui est 4,79 ppm (Gottlieb *et al.* 1997 ; Fulmer *et al.* 2010).

4.3.2. RMN du carbone-13

En RMN des liquides du carbone-13, la séquence utilisée est simple représentant une accumulation de 3000 acquisitions, avec un délai D_1 de 5 s, une impulsion $90^\circ P_1$ de 14 μ s et un découplage des protons durant l'acquisition.

Chapitre 4.3

Traitement statistique des données

1. MESURE DE L'ERREUR EXPERIMENTALE

Les acquisitions des données RMN pour tous les échantillons se sont faites dans des conditions analogues. Cependant, deux spectres du même échantillon acquis dans les mêmes conditions ne seront pas strictement superposables et cela pour plusieurs raisons. D'une part, il existe de légères variations du champ magnétique au cours de l'acquisition ; il est en effet impossible d'avoir une homogénéité de champ parfaite d'autant plus que la durée d'acquisition est longue. D'autre part, avant toute interprétation, chaque spectre fait l'objet d'ajustement que ce soit au niveau du phasage du spectre ou de la correction de sa ligne de base, ces deux manipulations pouvant être automatisées ou manuelles. Il convient donc de quantifier cette variation expérimentale.

Pour ce faire nous avons acquis 7 spectres d'un échantillon de référence de glycine cristalline dont nous avons référencé le déplacement chimique grâce à son groupe carboxyle qui se situe à 176,03 ppm. Les acquisitions se sont faites par spectroscopie de RMN des solides du carbone-13 en utilisant une séquence CPMAS à 10 kHz (1 024 acquisitions, temps de contact τ_c de 1,2 ms, délai D_1 de 5 s). Pour chaque spectre, nous avons ajusté la phase manuellement, réalisé une correction automatique de la ligne de base puis nous avons déterminé automatiquement l'intensité des deux pics émanant de la glycine (celui du groupe carboxyle et celui du groupe méthylène) et nous avons intégré manuellement ces deux pics (Figure 32).

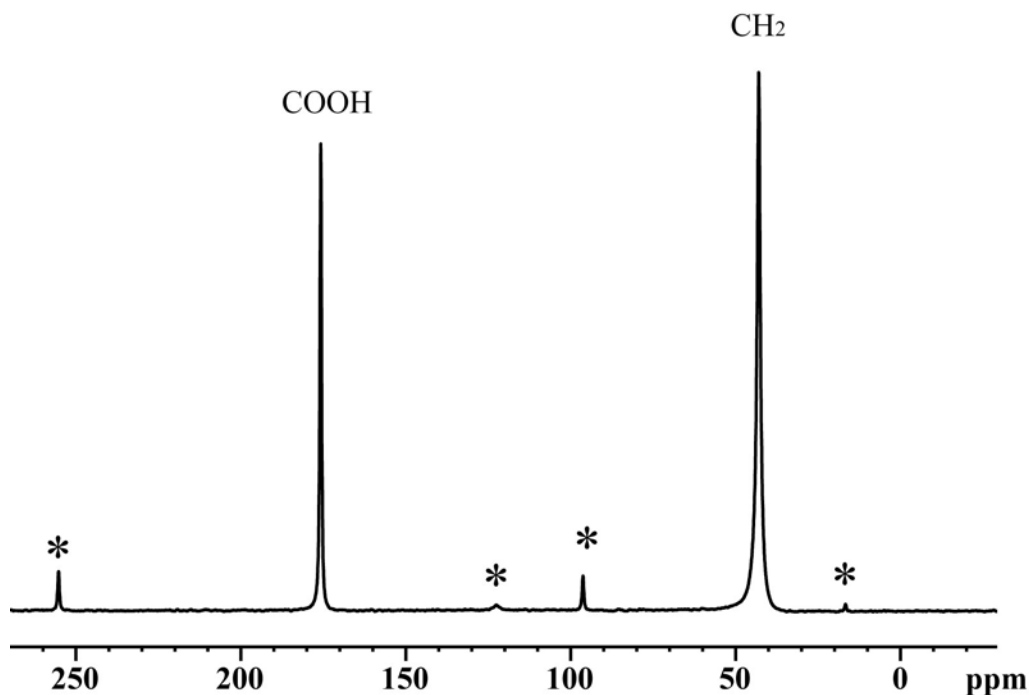


Figure 32 – Spectre d'un échantillon de glycine cristalline obtenu en RMN du carbone-13

* : bande de rotation

Informations : masse = 117 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 1 024 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,2$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Ces données nous ont permis d'une part de calculer le coefficient de variation et d'autre part l'intervalle de confiance de la mesure. Le coefficient de variation ou écart type relatif permet d'appréhender la dispersion des mesures autour de la mesure moyenne, on obtient ainsi l'amplitude de la variabilité de cette mesure. Il est égal au rapport entre l'écart type et la moyenne des mesures réalisées (*vide infra*). L'intervalle de confiance nous permet d'avoir une idée sur la précision de la mesure puisqu'il détermine l'intervalle dans lequel 95 % des mesures sont situées.

2. TESTS STATISTIQUES

Au cours de notre étude, nous allons tenter de corréler les aires et intensités spectrales obtenues sur les spectres RMN avec différents variables que nous supposons susceptibles d'influencer ces valeurs. Ces variables peuvent être de deux types : quantitative (âge au décès, intervalle *post mortem*) ou qualitative (sexe des individus, conditions de conservation des sujets).

Avant d'appliquer un test statistique, il est nécessaire de vérifier que les données que nous souhaitons analyser suivent ou non une loi Normale qui est une loi de probabilité continue. Pour

tester cette hypothèse nous utilisons un test de normalité, le **test de Shapiro-Wilk**. Si la p -valeur est supérieure à 0,05, les données suivent une loi Normale et il convient d'utiliser des tests paramétriques. En revanche, si la p -valeur est inférieure ou égale à 0,05, les données ne suivent pas une loi Normale et il faut alors utiliser des tests non paramétriques. Dans notre étude, nos variables ne suivent pas une loi Normale, à quelques exceptions près. Nous avons donc choisi d'utiliser des tests non paramétriques compatibles avec l'utilisation de données suivant une loi Normale.

Nous avons donc choisi d'utiliser deux tests différents : le test de Wilcoxon et un test de corrélation linéaire (Saporta 2006). Nous considérerons qu'un test est significatif au seuil α de 5 % si la p -valeur est inférieure ou égale à 0,05 ($p \leq 0,05$). Ce seuil de significativité est un seuil fréquemment rencontré en sciences.

Le **test de Wilcoxon** est un test non paramétrique permettant de tester des variables appariées. Il teste la différence de la médiane dans chaque groupe (ici chez les hommes et chez les femmes) par rapport à 0. Ce test permet donc de voir si la distribution d'une variable (ici l'intensité spectrale par exemple) au sein d'un échantillon est identique quel que soit le groupe considéré (le sexe des individus par exemple). On teste donc l'influence du sexe des individus sur les aires et les intensités spectrales.

Le test de corrélation linéaire utilisant le **coefficient de corrélation linéaire de Pearson** permet de mesurer la relation entre deux variables continues (quantitatives) qui seraient liées par une relation de proportionnalité ($y = ax + b$). Ce coefficient r est compris entre -1 et 1 et lorsqu'il est égal à 0 il signifie une absence absolue de liaison linéaire entre les deux variables. Il faut noter que le fait que deux variables soient corrélées ne signifie rien d'autre que le fait qu'il existe un lien entre elles les poussant à évoluer plus ou moins conjointement. Cela ne signifie en aucun cas qu'il existe un lien de causalité entre l'évolution de ces deux variables. Dans nos analyses nous utiliserons le **coefficient de détermination R^2** ($R^2 = r \times r$) (Cornillon et Matszner-Lober 2007).

Afin de comparer différentes mesures réalisées sur une même variable (par exemple comparaison des aires obtenues sur deux fémur contro-latéraux ou comparaison de différentes mesures d'un même pic pour tester notre erreur expérimentale), nous avons calculé le coefficient de variation. Le **coefficient de variation** ou écart type relatif permet d'appréhender la dispersion des mesures autour de la mesure moyenne, on obtient ainsi l'amplitude de la variabilité de cette mesure. Il est égal au rapport entre l'écart type et la moyenne des mesures réalisées. Il est à noter que l'on emploie le terme de déviation relative lorsque seulement deux mesures sont concernées.

CINQUIEME PARTIE

Résultats

Chapitre 5.1

Validation méthodologique du protocole d'étude d'échantillons osseux par RMN

Le tissu osseux étant un matériau peu souvent analysé par RMN des solides, nous avons validé notre protocole d'analyse avant de l'appliquer à nos échantillons et inférer des hypothèses concernant l'estimation du délai *post mortem*. Tout d'abord, nous avons identifié les constituants du tissu osseux au regard des données publiées dans la littérature. Ensuite, nous avons déterminé l'erreur expérimentale de nos mesures obtenues à partir des spectres RMN. Puis, nous avons déterminé les paramètres d'acquisition optimaux propres au matériel que nous utilisons c'est-à-dire le tissu osseux.

1. IDENTIFICATION SPECTRALE DES CONSTITUANTS DU TISSU OSSEUX

1.1. ANALYSE EN RMN DU CARBONE-13

1.1.1. Matière organique

Collagène de type I

Le collagène de type I présente une séquence de trois acides aminés se répétant n fois, avec la glycine qui représente un acide aminé sur trois. La séquence est de type $(\text{Gly-X-Y})_n$ c'est-à-dire, par exemple :



Les atomes de carbone contenus dans les acides aminés sont nommés en fonction de leur position par rapport au groupement carboxyle COOH . Ainsi, le premier carbone suivant le groupement COOH sera un carbone α ($\text{C}\alpha$), le second un carbone β ($\text{C}\beta$), et ainsi de suite (Figure 33). Cette position du carbone au sein de la chaîne de l'acide aminé va entraîner un déplacement chimique du pic correspondant permettant ainsi son individualisation si nous analysons chaque acide aminé séparément. Au sein du collagène, certains pics vont présenter le même déplacement chimique ce qui accentuera l'intensité de ce pic.

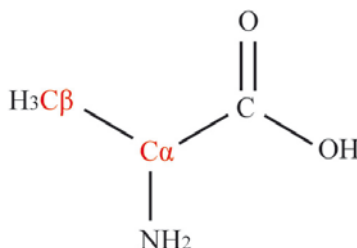


Figure 33 – Exemple de dénomination des différents atomes de carbone au sein d'un acide aminé : l'alanine

Les gammes de déplacements chimiques moyennes obtenues sur du collagène osseux humain ou animal déterminées par différents auteurs (Saito *et al.* 1984 ; Fujisawa et Kuboki 1990 ; Zhu *et al.* 2009) sont représentées dans la Figure 34 et données dans le Tableau 13.

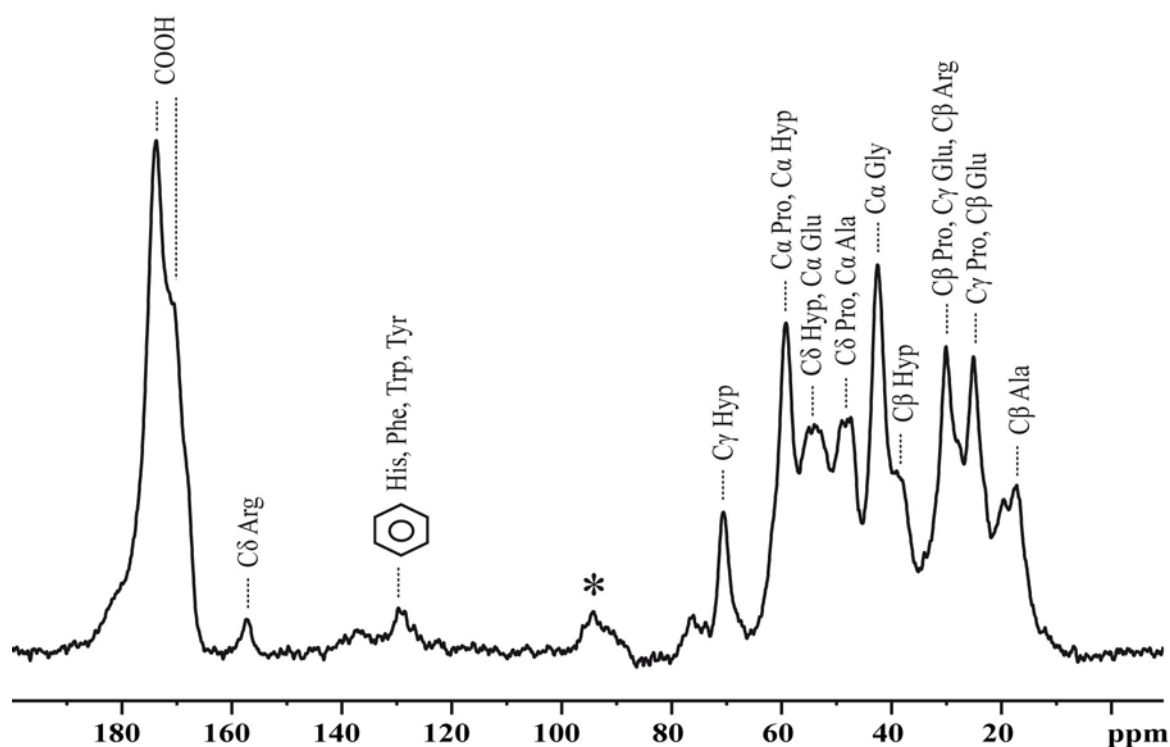


Figure 34 – Spectre obtenu en RMN du carbone-13 de l'échantillon EC12-2652 non lyophilisé et attribution des pics de résonance des acides aminés contenus dans le collagène

* : bande de rotation

Informations : masse initiale = 122,6 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Tableau 13 – Gamme de déplacements chimiques en RMN CPMAS du carbone-13 des principaux acides aminés contenus dans le collagène osseux (d'après Saito et al. 1984 ; Fujisawa et Kuboki 1990 ; Zhu et al. 2009)

Acide aminé	Position du carbone au sein de l'acide aminé	Gamme de déplacements chimiques (ppm)
Glycine	C α	42,7 – 43,3
Proline	C α	58,2 – 59,7
	C β	29,1 – 30,5
	C γ	24,1 – 25,2
	C δ	47,1 – 47,6
Hydroxyproline	C α	58,2 – 59,7
	C β	37,6 – 38,8
	C γ	70,1 – 70,8
	C δ	53,2 – 54
Alanine	C α	49,2 – 50,3
	C β	16,4 – 18,8
Acide glutamique	C α	53,2 – 54
	C β	24,9 – 25,2
	C γ	28,3
Arginine	C β	30,2 – 30,5
	C δ	157,5 – 157,6
Histidine Phénylalanine Tryptophane Tyrosine	Carbones des cycles aromatiques	128,8 – 129,7
Tous les acides aminés	Groupements carboxyle et carbonyle	167,4 – 173,9

Lipides

Schématiquement les lipides sont composés d'une tête polaire hydrophile présentant certains groupements chimiques (*e.g.* groupement azoté, groupement carboxyle, groupement phosphate) et une queue apolaire hydrophobe dont la chaîne aliphatique peut être plus ou moins saturée, reliées entre elles par un squelette glycérol : il s'agit des glycérophospholipides. Cependant, il existe plusieurs classes de lipides membranaires (Figure 35).

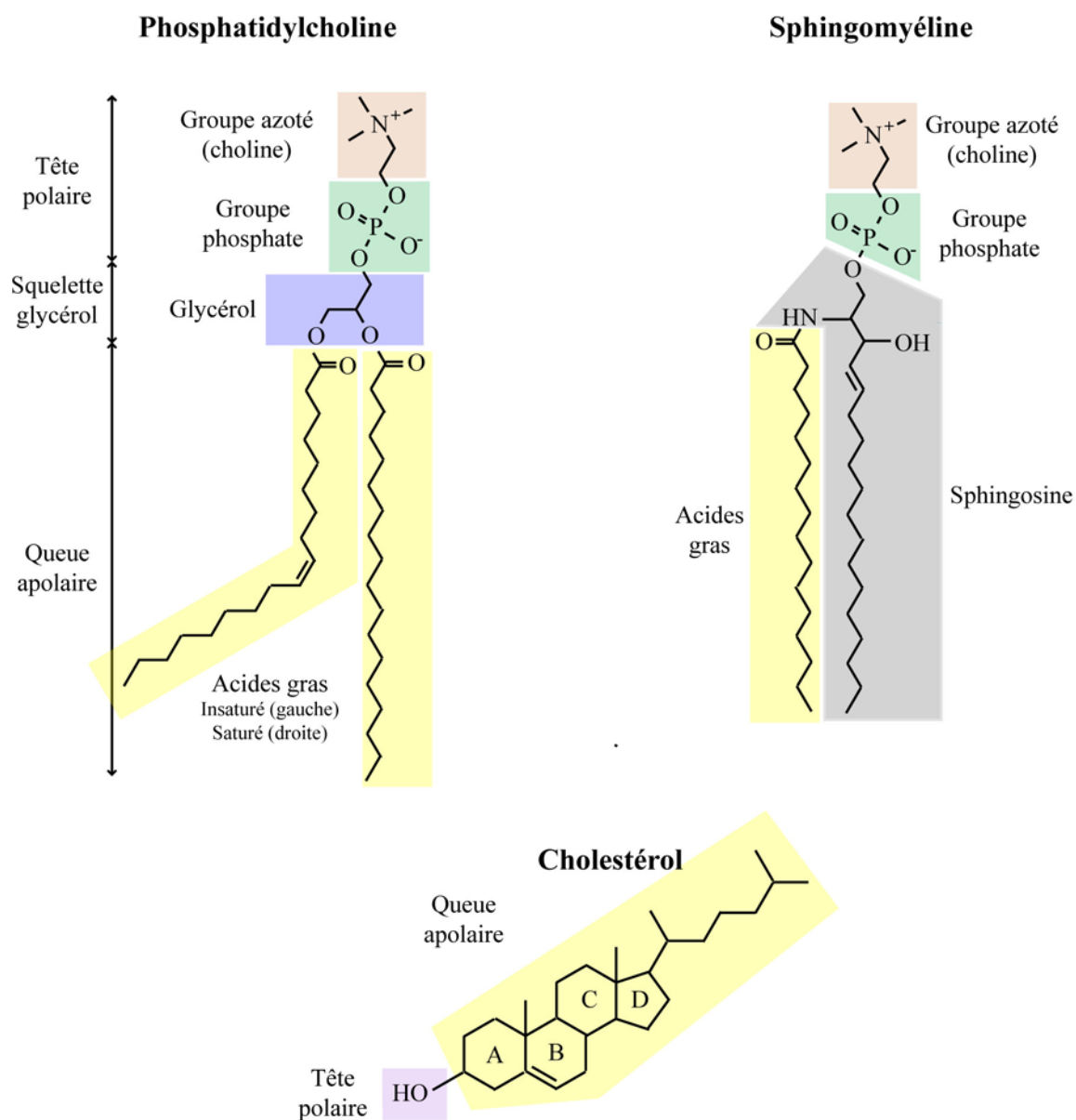


Figure 35 – Exemples de composition des lipides

Ces différentes composantes vont donc avoir des gammes de déplacements chimiques distinctes (Grélard *et al.* 2009) mais similaires à certains déplacements chimiques des acides aminés du collagène (Figure 36 et Tableau 14).

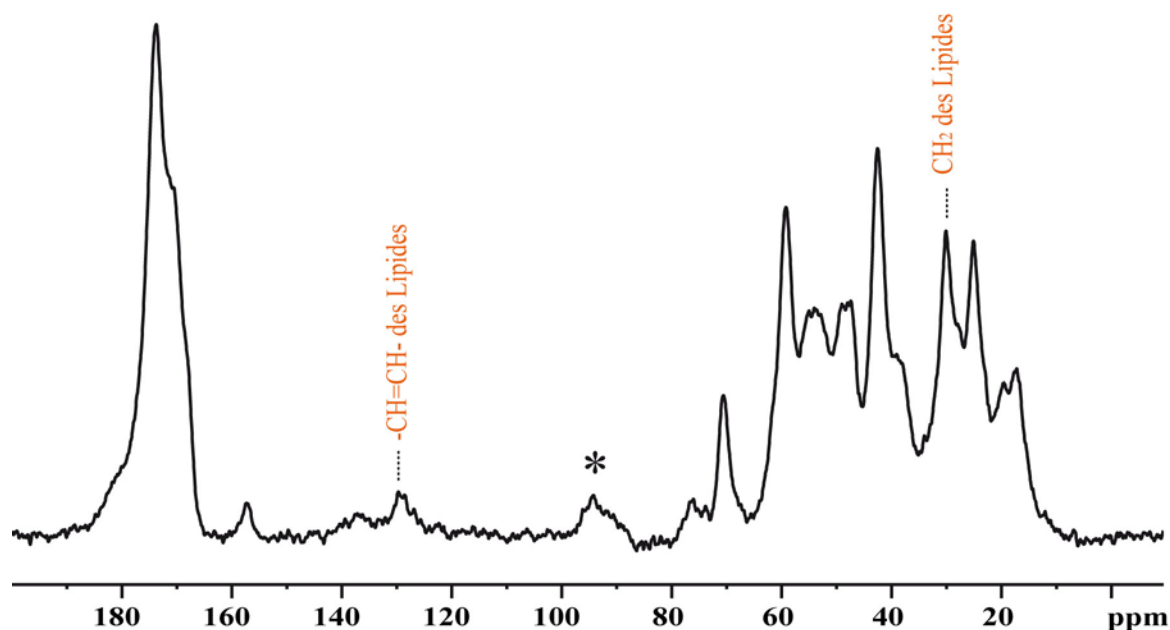


Figure 36 – Spectre obtenu en RMN du carbone-13 de l'échantillon EC12-2652 non lyophilisé et attribution des pics de résonance des lipides contenus dans le tissu osseux

* : bande de rotation

Informations : masse initiale = 122,6 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Tableau 14 – Gamme de déplacements chimiques en RMN du carbone-13 de trois lipides : phosphatidylcholine, sphingomyéline et cholestérol (d'après Soubias et al. 2004 ; Grélard et al. 2009)

Lipide	Groupement	Gamme de déplacements chimiques (ppm)
Phosphatidylcholine		
Tête polaire	CH ₂ -N	66,2
	CH ₂ -O	63,4
Squelette glycérol	Carbone G1	62,9
	Carbone G2	70,5
	Carbone G3	59,4
Chaîne aliphatique	-CH=CH-	127,8 – 129,9
	CH ₂ -C=O	173,8
	CH ₂	31,9
	CH ₃	14,1
Sphingomyéline		
Tête polaire	CH ₂ -N	66,3
	CH ₂ -O	63,4
Squelette sphingosine	Carbone S1	66,3
	Carbone S2	63
	Carbone S3	70,5
Chaîne aliphatique	-CH=CH-	129,7 – 130
	CH ₂ -C=O	173,2 – 173,6
	CH ₂ -C=O	34,3
	CH ₂	29,3 – 31,9
	CH ₃	14,1
Cholestérol		
Tête polaire	CH-OH	71,7
Squelette stérol	C quaternaire -C=	141,7
	C quaternaire	36,1 - 42
	CH	32,6 – 56,6
	=CH	119,8
	CH ₂	21 – 42
	CH ₃	11,8 – 19,3
Chaîne aliphatique	CH	27,5 – 36,2
	CH ₂	23,7 – 39,4
	CH ₃	22,5 – 22,7

Citrate

Le citrate ou acide citrique a pour formule chimique C₆H₈O₇, on parle alors de citrate monohydrate (Fischer *et al.* 1995) ou stœchiométrique qui est une forme cristalline non biologique, par opposition au citrate osseux (Hu *et al.* 2010) qui se présente sous forme de sels associés aux ions calcium, potassium ou sodium entre autres (Figure 37).

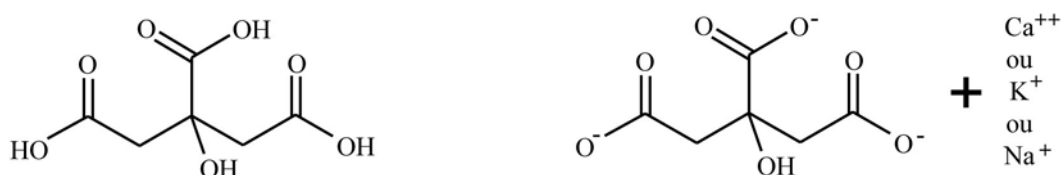


Figure 37 – Formules semi développées du citrate monohydrate (gauche) et du citrate osseux (droite)

Les trois groupes carboxyle du citrate présentent un déplacement chimique légèrement plus important que ceux des acides aminés ce qui permet de le distinguer de ces derniers. De même, le carbone quaternaire apparaît dans une zone dépourvue de signal du collagène rendant ainsi sa détection plus facile. En revanche, les deux groupes méthylène sont confondus avec le signal provenant de la chaîne aliphatique des acides aminés du collagène. Les déplacements chimiques de ces différents groupes donnés pour le citrate monohydrate et le citrate osseux sont représentés dans la Figure 38 et sont donnés dans le Tableau 15.

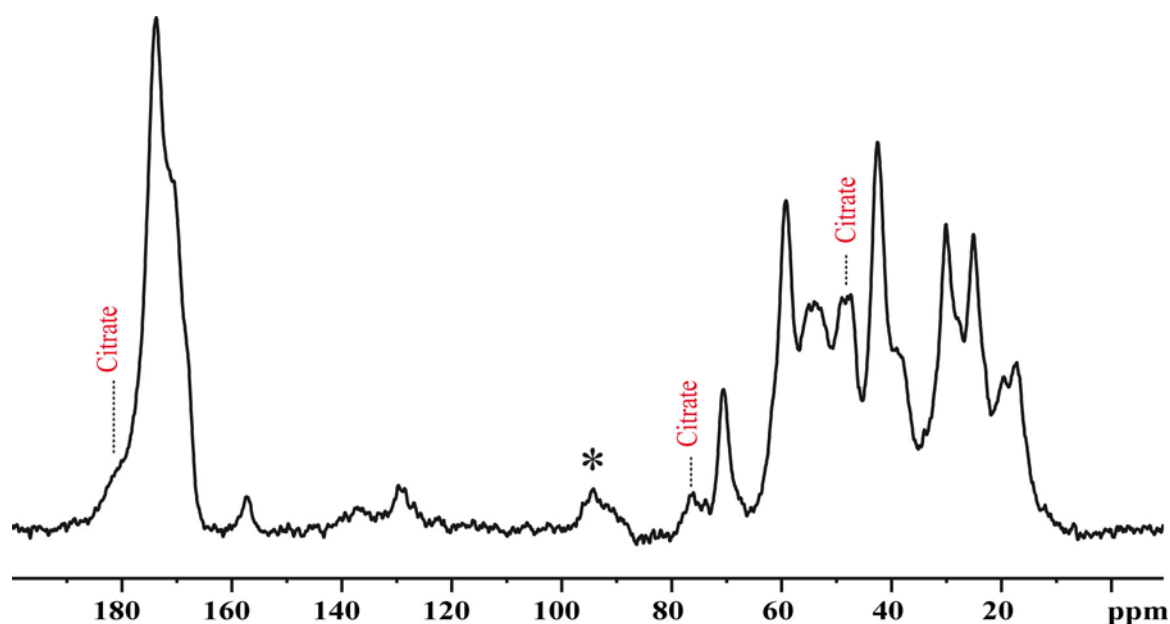


Figure 38 – Spectre obtenu en RMN du carbone-13 de l'échantillon EC12-2652 non lyophilisé et attribution des pics de résonance du citrate contenu dans le tissu osseux

* : bande de rotation

Informations : masse initiale = 122,6 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Tableau 15 – Gamme de déplacements chimiques en RMN du carbone-13 des groupes fonctionnels du citrate monohydrate et du citrate osseux (d'après Fischer et al. 1995 ; Hu et al. 2010)

Groupements	Gamme de déplacements chimiques (ppm)	
	Citrate monohydrate	Citrate osseux
Carboxyle COOH	174 – 178	182
Carbone quaternaire	76	76
Méthylène CH ₂	43,4 – 47,5	49

Les déplacements chimiques du citrate font cependant l'objet de controverses puisque certains auteurs (Wise et al. 2007 ; Reid et al. 2008) considèrent que les résonances à 76 et 182 ppm retrouvées dans le tissu osseux sont attribuables aux atomes de carbone des

glycoaminoglycanes (GAGs). Cependant Hu (Hu *et al.* 2010) estime que ces déplacements chimiques ne sont pas ceux des acides aminés du collagène mais que ce ne sont pas non plus ceux des sucres des GAGs car le groupement C-OH des sucres présente un atome d'hydrogène alors que l'acide citrique présente un carbone quaternaire. De plus, les GAGs possèdent des cycles dont la résonance devrait se retrouver dans les régions à 95 – 100 ppm.

Le spectre présenté dans la Figure 38 possède un pic de résonance dans la zone 95 – 100 ppm ; cependant, ce pic ne peut pas être attribué aux GAGs puisque qu'il s'agit en fait d'une bande de rotation des groupes carboxyle. Afin de vérifier cette information, nous avons comparé deux spectres réalisés sur un os frais (EC12-2693) pour lesquels seule la vitesse de rotation est différente (10 kHz vs. 8 kHz). La comparaison est présentée dans la Figure 39 et montre l'absence de signal dans la zone supposée des GAGs lorsque la vitesse de rotation est 8 kHz.

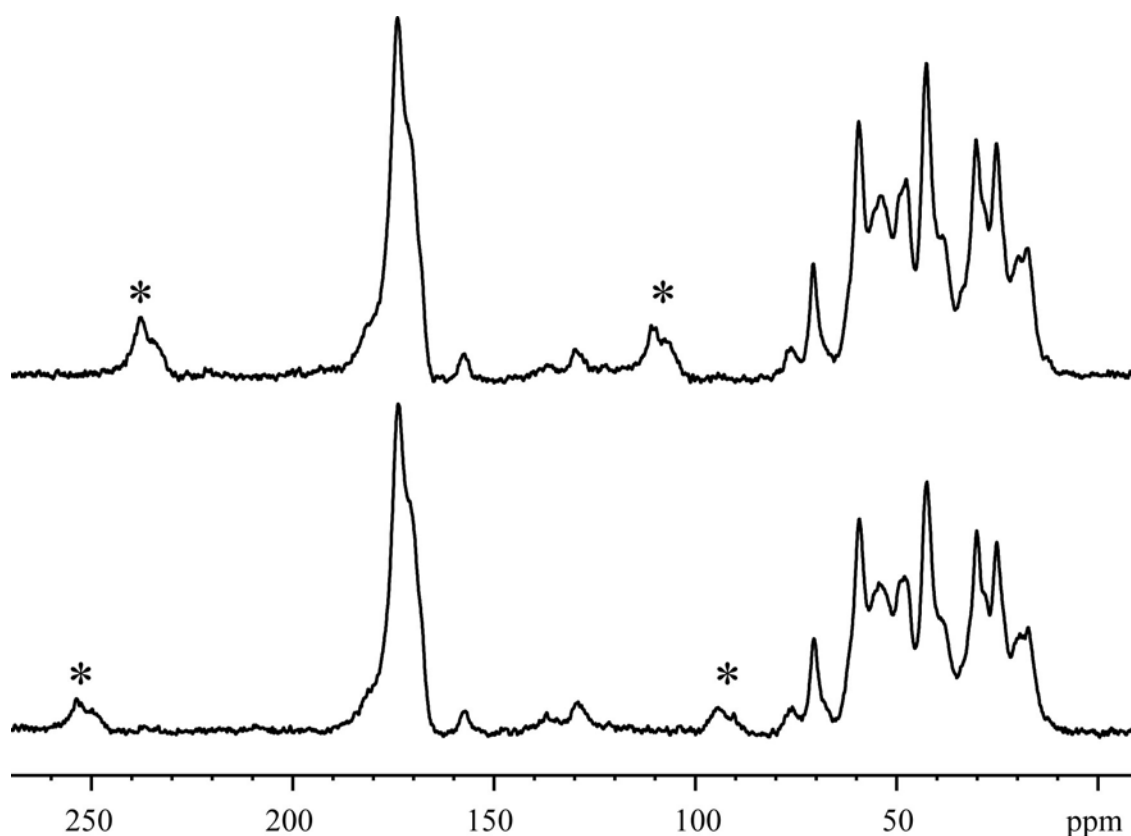


Figure 39 – Spectres RMN CPMAS du carbone-13 de l'individu EC12-2693 avec une vitesse de rotation de 10 kHz (haut) et une vitesse de rotation de 8 kHz (bas)

* : bande de rotation

Informations : masse initiale = 128,2 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

1.1.2. Matière minérale

La matière minérale contenue dans l'os est essentiellement de l'hydroxyapatite de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Cette forme stœchiométrique ne présente donc pas d'atome de carbone et ne peut donc pas être analysée en RMN du carbone. Dans ses formes biologiques, des groupements carbonate CO_3 peuvent se substituer aux groupements phosphate PO_4 ; cependant, les groupements carbonate résonnent à la même fréquence que les différents groupements carboxyle COOH des acides aminés contenus dans le collagène de type I osseux ce qui les rend leur détection difficile (Papenguth *et al.* 1989).

1.1.3. Synthèse

Nous constatons que différentes molécules, qu'elles soient organiques ou minérales, présentent les mêmes déplacements chimiques. Cela provoque donc une superposition des pics et une augmentation de leur intensité. Nous avons illustré dans la Figure 40 l'attribution de chaque groupe chimique présent au sein d'un os récent (ici l'individu EC12-2652).

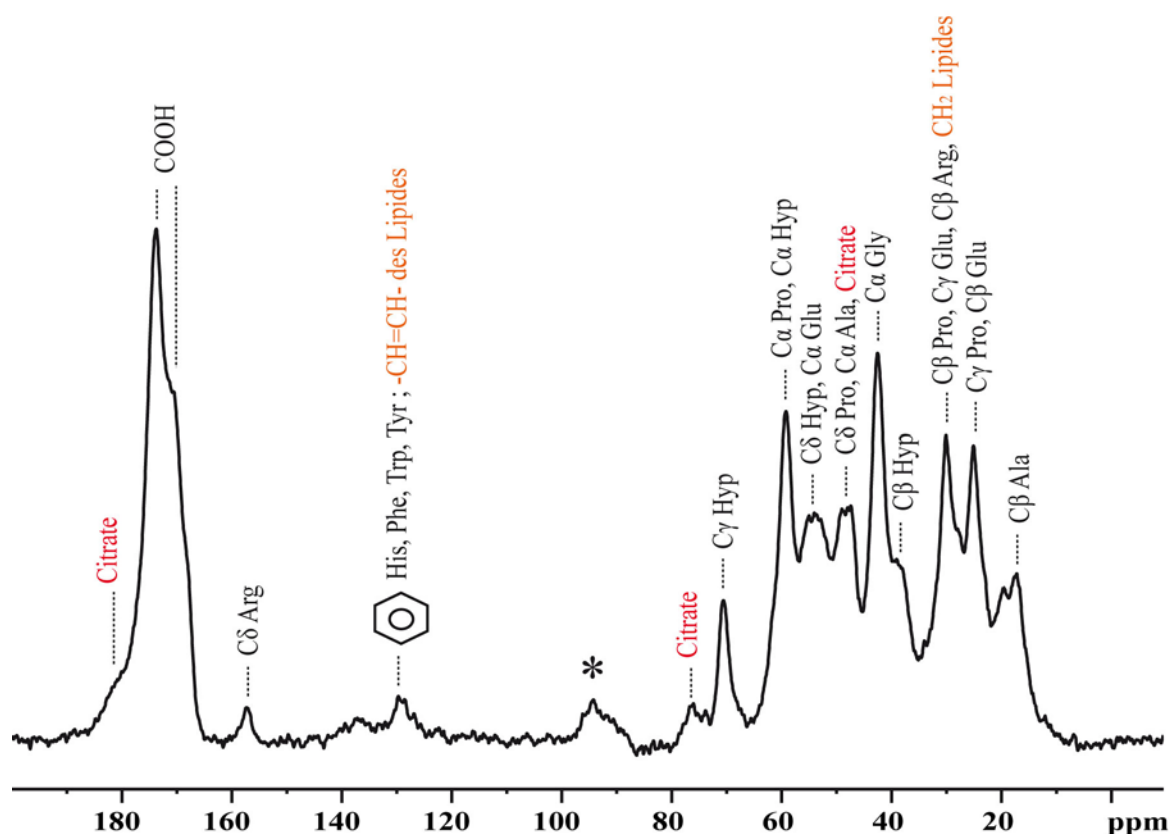


Figure 40 – Spectre obtenu en RMN du carbone-13 de l'échantillon EC12-2652 non lyophilisé et attribution des pics de résonance précédemment identifiés

* : bande de rotation

Informations : masse = 122,6 mg

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

1.2. ANALYSE EN RMN DU PROTON

1.2.1. Matière organique

Collagène de type I

Les gammes de déplacements chimiques des atomes d'hydrogène contenus dans les acides aminés du collagène sont connues (Bundi et Wüthrich 1979 ; Wishart *et al.* 1995) et sont répertoriées dans le Tableau 16.

Tableau 16 – Gamme de déplacements chimiques en RMN du proton des principaux acides aminés contenus dans le collagène osseux (d'après Bundi et Wüthrich 1979)

Acide aminé	Groupement	Gamme de déplacements chimiques (ppm)
Glycine	CH ₂	3,97
	NH ₂	8,39
Proline et Hydroxyproline	CαH ₂	4,44
	CβH ₂ et CγH ₂	2,02 – 2,28
Alanine	CH	4,35
	CH ₃	1,39
	NH ₂	8,25
Histidine Phénylalanine Tryptophane Tyrosine	CH du cycle aromatique	7,14 – 8,12

Lipides

Il existe une grande variété de lipides qui peuvent être retrouvés au sein du tissu osseux. Ces lipides possèdent des chaînes hydrophobes de 4 à 28 atomes de carbones (rarement plus) présentant eux-mêmes de 1 à 3 atomes d'hydrogène en fonction de leur position au sein de la chaîne et du degré de saturation de cette dernière. Les gammes de déplacements chimiques couramment rencontrées sont listées dans le Tableau 17.

Tableau 17 – Gamme de déplacements chimiques en RMN du proton de trois lipides : phosphatidylcholine, sphingomyéline et cholestérol (d'après Soubias et al. 2004 ; Grélard et al. 2009)

Lipide	Groupement	Gamme de déplacements chimiques (ppm)
Phosphatidylcholine		
Tête polaire	CH ₂ -N	3,65
	CH ₂ -O	4,25
Squelette glycérol	H du carbone G1	4,14 – 4,39
	H du carbone G2	5,21
	H du carbone G3	3,92
Chaîne aliphatique	-CH=CH-	5,36
	CH ₂ -C=O	2,25
	CH ₂	1,25
	CH ₃	0,88
Sphingomyéline		
Tête polaire	CH ₂ -N	3,92
	CH ₂ -O	3,72
Squelette sphingosine	H du carbone S1	3,92
	H du carbone S2	5,21
	H du carbone S3	4,14
Chaîne aliphatique	-CH=CH-	5,36
	CH ₂	1,25
	CH ₃	0,88
Cholestérol		
Tête polaire	CH-OH	3,51
Squelette stérol	CH	0,88 – 5,21
	CH ₂	1,12 – 2,28
	CH ₃	0,67 – 0,97
Chaîne aliphatique	CH	1,26 – 1,40
	CH ₂	0,85 – 1,31
	CH ₃	0,71 – 0,90

Nous constatons que ces gammes de déplacements chimiques varient beaucoup en fonction du lipide considéré. D'une manière générale, dans ces différentes familles de lipides, nous pouvons synthétiser les gammes de déplacements chimiques des groupements chimiques les plus fréquemment rencontrés au sein des têtes polaires et des chaînes aliphatiques (Tableau 18).

Tableau 18 – Gamme de déplacements chimiques en RMN du proton des lipides (d'après Guillen et Ruiz 2003a, b ; Ren et al. 2008 ; Yeung et al. 2008 ; Grélard et al. 2009)

Groupe fonctionnel	Gamme de déplacements chimiques
Tête polaire	
CH ₂ -OCOR	3,51 – 4,35
CH ₂ -N	3,65 – 3,92
CH ₂ -O	3,72 – 4,25
Chaîne aliphatique	
OCO-CH ₂ -CH ₂	2,25 – 2,36
OCO-CH ₂ -CH ₂	1,55 – 1,70
-CH=CH-	5,30 – 5,80
=HC-CH ₂ -CH	2,73 – 2,87
(CH ₂) _n -CH=CH-	1,93 – 2,13
(CH ₂) _n	1,20 – 1,43
CH ₃	0,82 – 0,94

Citrate

Le citrate présente trois groupes carboxyle COOH, un groupe hydroxyle OH, deux groupes méthylène et un carbone quaternaire. Les résonance des groupes méthylène sont rapportés à 2,74 et 2,92 ppm (Ma *et al.* 1997). De manière générale, le citrate a peu été étudié en RMN du proton expliquant que l'on ne retrouve que peu de données concernant les déplacements chimiques de ses groupements.

1.2.2. Matière minérale

Il s'agit essentiellement de l'hydroxyapatite et sa composition fait qu'elle ne devrait être observée que par le groupement hydroxyle OH qu'elle possède, et ne devrait donc présenter qu'un seul pic de résonance. On retrouve celui-ci vers 0 ppm. En biologie, elle existe sous forme substituée que ce soit au niveau du groupement phosphate PO₄ ou du groupement hydroxyle OH. Il existe un consensus général (Rey *et al.* 1995 ; Ramanathan et Ackerman 1999 ; Wu *et al.* 2002 ; Cho *et al.* 2003) affirmant que les cristaux minéraux du tissu osseux, la bio-hydroxyapatite, sont déficients en groupements hydroxyle, Cho (Cho *et al.* 2003) estime même leur présence à 21 % comparée à l'hydroxyapatite stœchiométrique.

Sur la bio-hydroxyapatite, les pics de résonance retrouvés apparaissent à 0,1 – 0,2 ppm pour les groupements hydroxyle et entre 5,4 – 5,8 ppm pour l'eau adsorbée sur le cristal (Cho *et al.* 2003 ; Jaeger *et al.* 2005 ; Wilson *et al.* 2006).

1.2.3. Synthèse

Même si les protons provenant du collagène et ceux issus des lipides possèdent des gammes de déplacements chimiques relativement distinctes, les spectres RMN du proton ne mettent en évidence le plus souvent que les signaux des lipides (Figure 41). Ceci peut s'expliquer par le fait que la vitesse de rotation à l'angle magique, bien qu'élevée (10 kHz) n'est pas suffisante pour apporter une résolution pour les protons associés au collagène qui sont très immobilisés au sein de l'os. Ceux-ci apparaissent alors comme une bande très large et non résolue de -5 ppm à 15 ppm. Comme la vitesse de rotation est insuffisante, on voit clairement apparaître des bandes de rotation à ± 10 kHz de la bande centrale. Les lipides, intrinsèquement plus mobiles sont eux résolus (Figure 42).

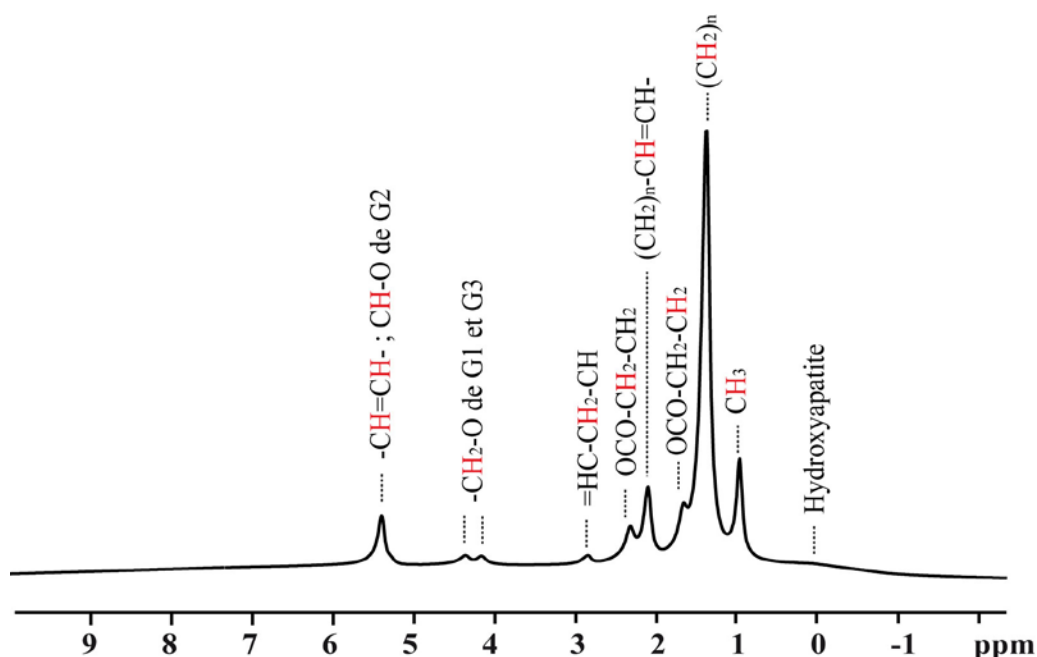


Figure 41 – Spectre obtenu en RMN du proton de l'échantillon EC12-2652 après lyophilisation et attribution des pics de résonance précédemment identifiés

Informations : masse = 122,6 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

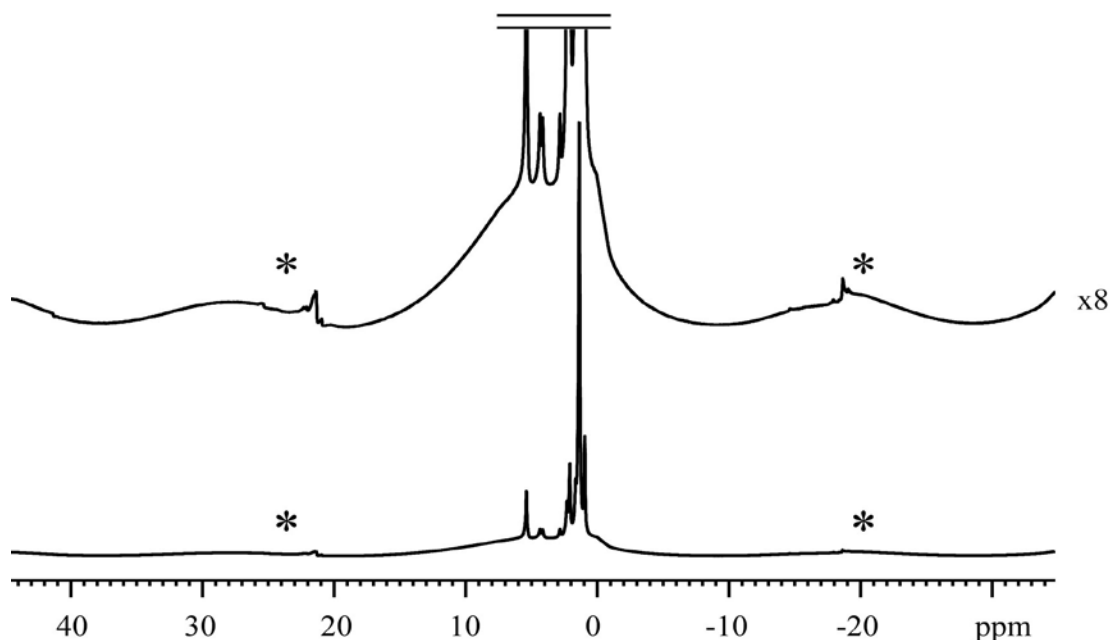


Figure 42 – Spectre obtenu en RMN du proton de l'échantillon EC12-2652 après lyophilisation et ses bandes de rotation

* : bande de rotation

Informations : masse = 122,6 mg

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

1.3. ANALYSE EN RMN DU PHOSPHORE-31

1.3.1. Matière organique

Collagène

Les acides aminés contenus dans le collagène osseux ne présentent pas de groupe phosphate, ils ne sont donc pas présents sur un spectre RMN du phosphore-31.

Lipides

Les lipides simples présentent un groupe phosphate PO_4 au niveau de leur tête polaire. Rappelons que la masse des lipides représente seulement 3 % de la masse de la matière organique, qui représente elle-même 25 % du poids d'un os. Le signal provenant de ces groupes phosphate est donc difficilement identifiable.

Citrate

Le citrate est une molécule ne présentant aucun atome de phosphore, elle n'est donc pas présente sur les spectres RMN du phosphore-31.

1.3.2. Matière minérale

L'hydroxyapatite est le constituant essentiel de la matière minérale de l'os cependant, au niveau osseux, on ne le retrouve pas sous sa forme stœchiométrique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ mais sous une forme substituée $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2+x}$. Les groupes faisant l'objet d'une substitution sont essentiellement les groupes phosphate PO_4 . Ces groupes peuvent alors se retrouver sous la forme HPO_4 .

Ces groupes phosphate sont identifiables sur un spectre RMN du phosphore-31, malheureusement, le signal correspondant forme un pic unique et relativement large centré à un déplacement chimique de 3 ppm (Roufosse *et al.* 1984 ; Kaflak-Hachulska *et al.* 2003 ; Kolodziejski 2004 ; Kaflak *et al.* 2006).

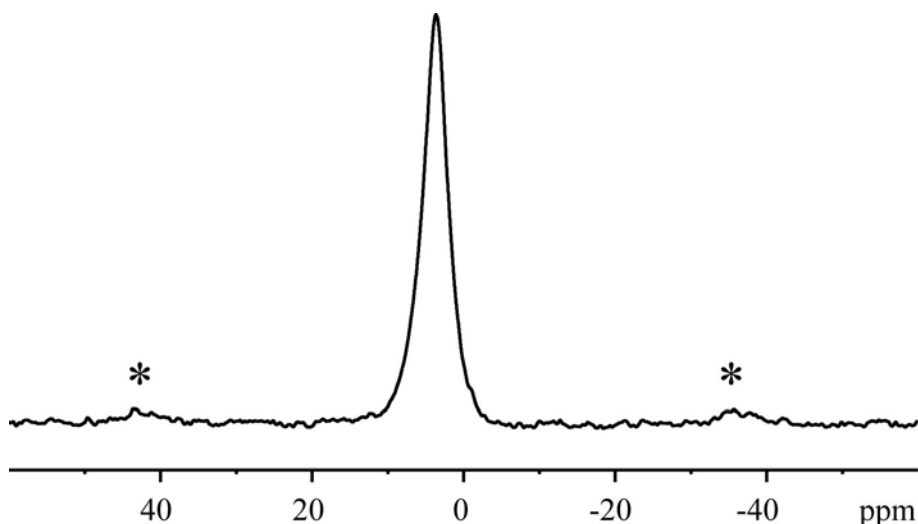


Figure 43 – Spectre obtenu en RMN du phosphore-31 de l'échantillon IRCGN-19 non lyophilisé

* : bande de rotation

Informations : masse = 94 mg

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du phosphore de 202,34 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 8 kHz ; 26 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 6,1$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

1.3.3. Synthèse

Bien que l'atome de phosphore soit un noyau intéressant à étudier dans les problématiques touchant à la biologie et plus particulièrement dans celles concernant le tissu osseux, la RMN du phosphore ne permet pas l'obtention d'information spécifique mais permet juste de confirmer de la présence de groupe phosphate PO_4 dans l'échantillon. Dans la suite de ce travail, nous n'utiliserons donc pas la RMN du phosphore-31 pour nos échantillons.

2. DETERMINATION DE L'ERREUR EXPERIMENTALE

Afin de déterminer notre erreur expérimentale, nous avons comparé les résultats obtenus sur 7 spectres d'un échantillon de glycine réalisé dans les mêmes conditions expérimentales. Les coefficients de variation et les intervalles de confiance ont été établis en tenant compte de l'intensité et de l'aire spectrales pour les deux groupements chimiques fonctionnels de la glycine (groupe carboxyle COOH et groupe méthylène CH_2) par RMN du carbone-13. Les résultats sont présentés dans le Tableau 19.

Tableau 19 – Coefficients de variation obtenus pour les mesures de l'intensité et de l'aire des groupes fonctionnels sur un échantillon de glycine en RMN des solides du carbone-13

Expérience	Intensité absolue		Aire normalisée ^a	
	Groupe carboxyle COOH	Groupe méthylène CH ₂	Groupe carboxyle COOH	Groupe méthylène CH ₂
1	34,03 10 ⁶	38,17 10 ⁶	1,00	2,05
2	34,15 10 ⁶	38,29 10 ⁶	1,02	2,06
3	32,82 10 ⁶	37,84 10 ⁶	0,96	2,03
4	33,32 10 ⁶	37,94 10 ⁶	0,99	2,03
5	33,66 10 ⁶	38,10 10 ⁶	1,01	2,04
6	33,07 10 ⁶	37,84 10 ⁶	0,99	2,04
7	32,13 10 ⁶	37,53 10 ⁶	0,96	2,02
Moyenne	33,31 10 ⁶	37,96 10 ⁶	0,99	2,04
Écart type	0,71 10 ⁶	0,26 10 ⁶	0,02	0,01
Coefficient de variation	0,021	0,007	0,023	0,007
Intervalle de confiance à 95 %	± 527 556 ± 1,6 %	± 189 108 ± 0,5 %	± 0,01 ± 1,7 %	± 0,01 ± 0,5 %

^a Toutes les aires ont été normalisées par rapport à l'aire du groupe carboxyle mesurée sur le premier échantillon de glycine analysé qui prend alors la valeur 1.

Informations : masse = 117 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 1 024 acquisitions ; D₁ = 5 s ; P₁ = 2,85 µs ; τ_c = 1,2 ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Nous constatons que les aires du groupe carboxyle et du groupe méthylène ne sont pas similaires alors que ces deux groupes chimiques possèdent tous les deux un seul atome de carbone. Cette différence s'explique par le transfert de polarisation qui se produit entre les protons très abondants et les atomes de carbone-13. Le carbone du groupe carboxyle ne possède pas de proton qui lui est directement lié contrairement au carbone du groupe méthylène qui en possède deux. Le transfert de polarisation est donc meilleur pour ce groupe chimique.

Les coefficients de variation sont compris entre 0,7 % et 2,3 % ce qui correspond à des valeurs très peu dispersées de la mesure au cours des différentes séries d'acquisition. La reproductibilité et la précision des mesures sont donc très satisfaisantes. De même, l'intervalle de confiance à 95 % est défini au maximum à ± 1,7 % de la mesure réalisée ce qui est très satisfaisant aussi. Pour la suite de notre étude, sauf mention contraire, nous utiliserons l'intervalle de confiance maximal défini au cours de ce test c'est-à-dire ± 1,7 %.

L'analyse des intensités spectrales apporte des informations sur chaque carbone mais de façon moins précise que les aires spectrales. En effet, plus un pic est intense et fin, meilleure est la résolution spectrale, cependant un pic moins intense mais présentant une plus grande largeur de raie possède la même quantité de signal. La mesure de l'aire spectrale est donc une analyse plus précise mais moins ciblée de l'échantillon, car la mesure de l'aire est indépendante de la résolution et elle est directement proportionnelle au nombre d'atomes de carbone contenus dans l'échantillon. Nos résultats concernant la variabilité de la mesure de ces aires et intensités montrent que nous obtenons des intervalles de confiance similaires, dans ce cas, l'analyse des aires et des intensités donnera des informations avec une même précision.

3. NORMALISATION DES ECHANTILLONS PAR LA MASSE

Les échantillons que nous avons analysés en RMN du carbone-13 et du proton représentent une quantité de matière (de poudre d'os) de l'ordre d'une centaine de milligrammes. Cependant la masse analysée n'est pas strictement identique entre chaque échantillon et ceci pour plusieurs raisons : (1) les propriétés intrinsèques de l'os (*e.g.* module d'élasticité, substitutions ioniques, phénomène de recristallisation) qui le rendent plus ou moins facile à pulvériser ; (2) la quantité initiale disponible qui peut être limitée pour certains échantillons en raison de la présence de contamination de surface importante rendant le nettoyage mécanique invasif, d'une corticale peu épaisse diminuant *de facto* la quantité d'os cortical présent ; (3) le facteur humain lors du remplissage du rotor (tube inséré dans la sonde de mesure permettant l'analyse).

Nous avons choisi de comparer 5 échantillons de nature différente, provenant de milieux de conservation distincts et présentant des délais *post mortem* variés afin de déterminer l'effet de la masse analysée sur les profils spectraux obtenus (Tableau 20).

Tableau 20 – Liste des échantillons choisis pour étudier l'effet de la masse analysée sur les spectres en RMN du proton et du carbone-13

Identifiant	Nature	Os	Sexe	date de décès	Age au décès	Conservation
EC12-2693	Humain	Fémur	F	2012	72	Frais
IRCGN-01	Humain	Fémur	F	≈1995	50	Pleine terre
Simon AIG-10	Humain	Fémur	M	1954	42	Cercueil
SSPM3	Humain	Mandibule	I	I ^{er} -III ^e s. ap. J.-C.	I	Catacombe
SAairsol12	Animal	Fémur	I	2011	I	Air libre

F : femme ; M : homme ; I : donnée indéterminée ou inconnue

3.1. ANALYSE EN RMN DU PROTON

En RMN du proton, le signal le plus important provient de l'eau qui résonne vers 5 ppm et qui se retrouve sur tous les échantillons (Figure 44).

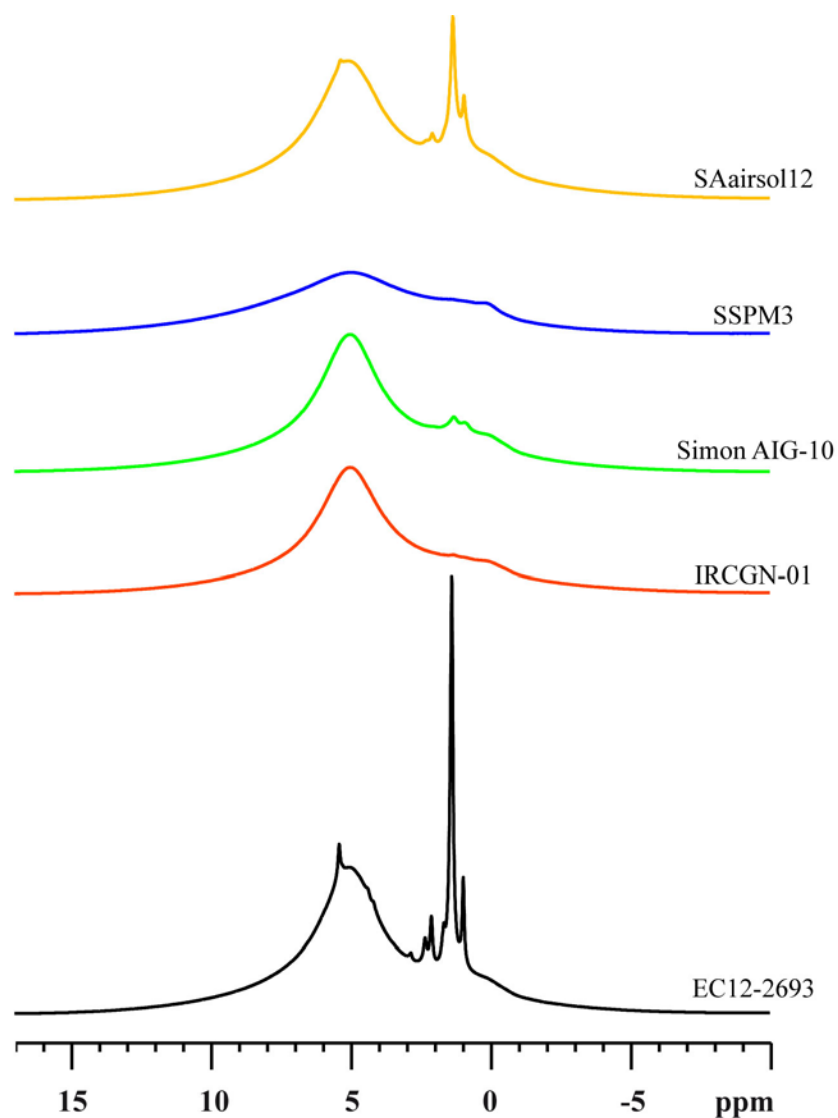


Figure 44 – Spectres RMN du proton de 5 sujets provenant de milieux de conservation différents et ayant des délais post mortem différents

Informations : masse (EC12-2693) = 125,6 mg ; masse (IRCGN-01) = 112,4 mg ; masse (Simon AIG-10) = 119,7 mg ; masse (SSPM3) = 114 mg ; masse (SAairsol12) = 143,1 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Nous observons des intensités spectrales différentes entre les échantillons avec une présence constante du pic relatif à l'eau (vers 5 ppm) et des intensités variables pour les autres pics (Figure 45).

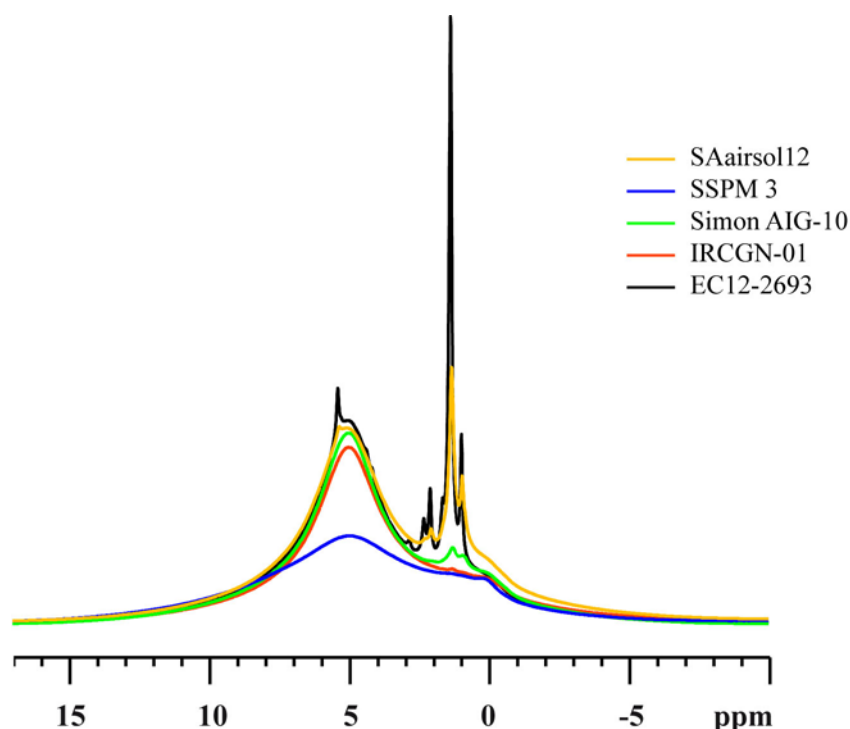


Figure 45 – Superposition des spectres RMN du proton de 5 sujets provenant de milieux de conservation différents et ayant des délais post mortem différents

Informations : masse (EC12-2693) = 125,6 mg ; masse (IRCGN-01) = 112,4 mg ; masse (Simon AIG-10) = 119,7 mg ; masse (SSPM3) = 114 mg ; masse (SAairsol12) = 143,1 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

La superposition des spectres permet de mettre en évidence un signal de l'eau constant pour échantillons (SSPM 3 excepté). Cependant des différences persistent et peuvent être soit propres à chaque échantillon (par exemple selon sa nature, ses caractéristiques), soit imputables à la masse analysée. Nous avons donc modulé les intensités spectrales de façon à comparer des spectres obtenus pour une même masse de poudre d'os par échantillon. Pour cela, nous avons rapporté la masse analysée à une masse équivalente de 100 mg en appliquant le rapport obtenu par la division de 100 par la masse analysée. Les différents rapports calculés sont fournis dans le Tableau 21.

Tableau 21 – Masse analysée et rapport à appliquer pour obtenir une masse équivalente de 100 mg pour chaque échantillon utilisé pour tester l'influence de la masse sur les aires et intensités spectrales en RMN du proton

Identifiant	Masse analysée (mg)	Rapport pour 100 mg
EC12-2693	125,6	0,80
IRCGN-01	112,4	0,89
Simon AIG-10	119,7	0,84
SSPM3	114	0,88
SAairsol12	143,1	0,70

Les spectres ainsi normalisés sont présentés dans la Figure 46 et leur superposition dans la Figure 47.

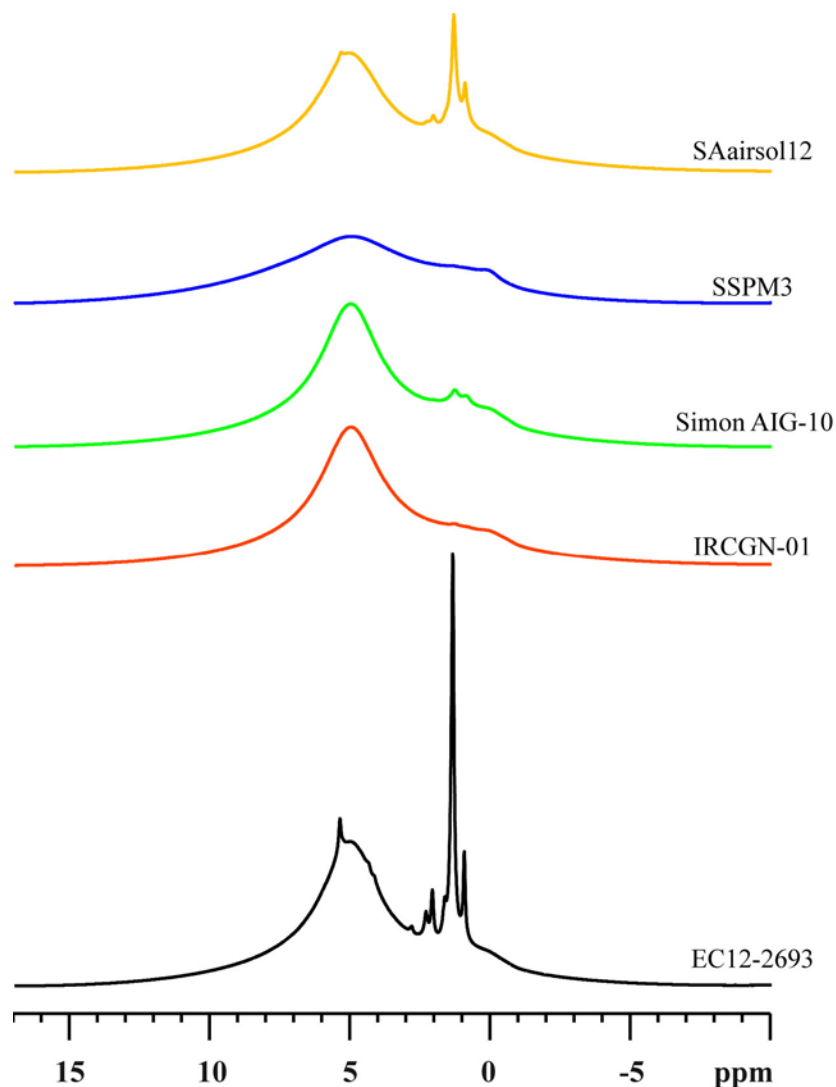


Figure 46 – Spectres RMN du proton de 5 sujets provenant de milieux de conservation différents et ayant des délais post mortem différents, après normalisation de leur masse à 100 mg

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse de 100 mg ; masse initiale (EC12-2693) = 125,6 mg ; masse initiale (IRCGN-01) = 112,4 mg ; masse initiale (Simon AIG-10) = 119,7 mg ; masse initiale (SSPM3) = 114 mg ; masse initiale (SAairsol12) = 143,1 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

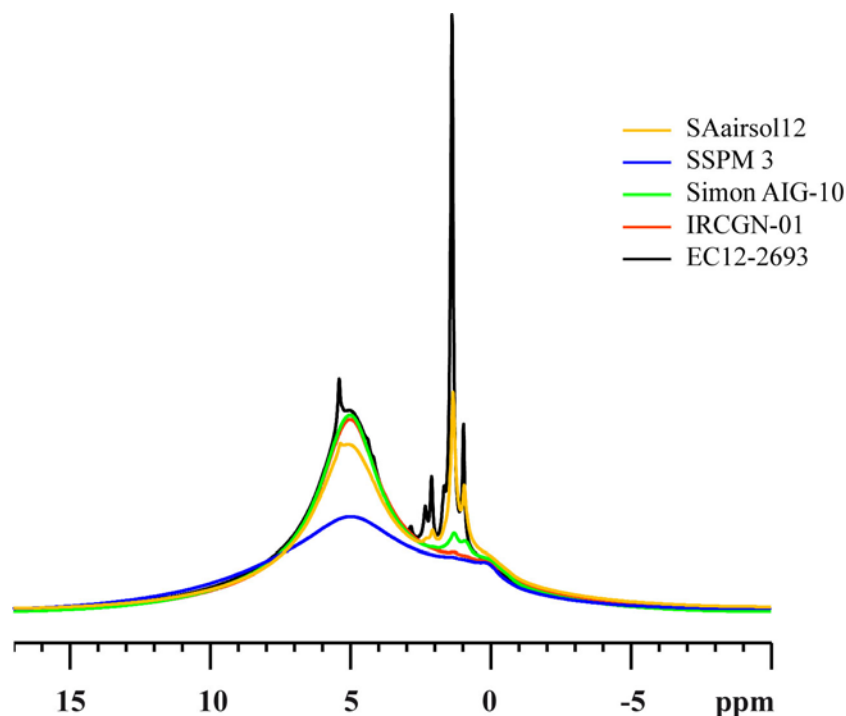


Figure 47 – Superposition des spectres RMN du proton de 5 sujets provenant de milieux de conservation différents et ayant des délais post mortem différents, après normalisation de leur masse à 100 mg

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse de 100 mg ; masse initiale (EC12-2693) = 125,6 mg ; masse initiale (IRCGN-01) = 112,4 mg ; masse initiale (Simon AIG-10) = 119,7 mg ; masse initiale (SSPM3) = 114 mg ; masse initiale (SAairsol12) = 143,1 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Nous constatons que les signaux de l'eau de 3 échantillons (EC12-2693, IRCGN-01 et Simon AIG-10) se superposent parfaitement. Il demeure cependant des différences d'intensité entre ces 5 échantillons qui ne peuvent donc pas seulement être attribuées à la masse analysée. Nous allons maintenant voir si les spectres RMN du carbone-13 nous apportent des informations complémentaires.

3.2. ANALYSE EN RMN DU CARBONE-13

Le signal RMN provient essentiellement de la matière organique du tissu osseux. Les spectres RMN du carbone-13 correspondant aux 5 échantillons précédemment étudiés en RMN du proton sont présentés dans la Figure 48.

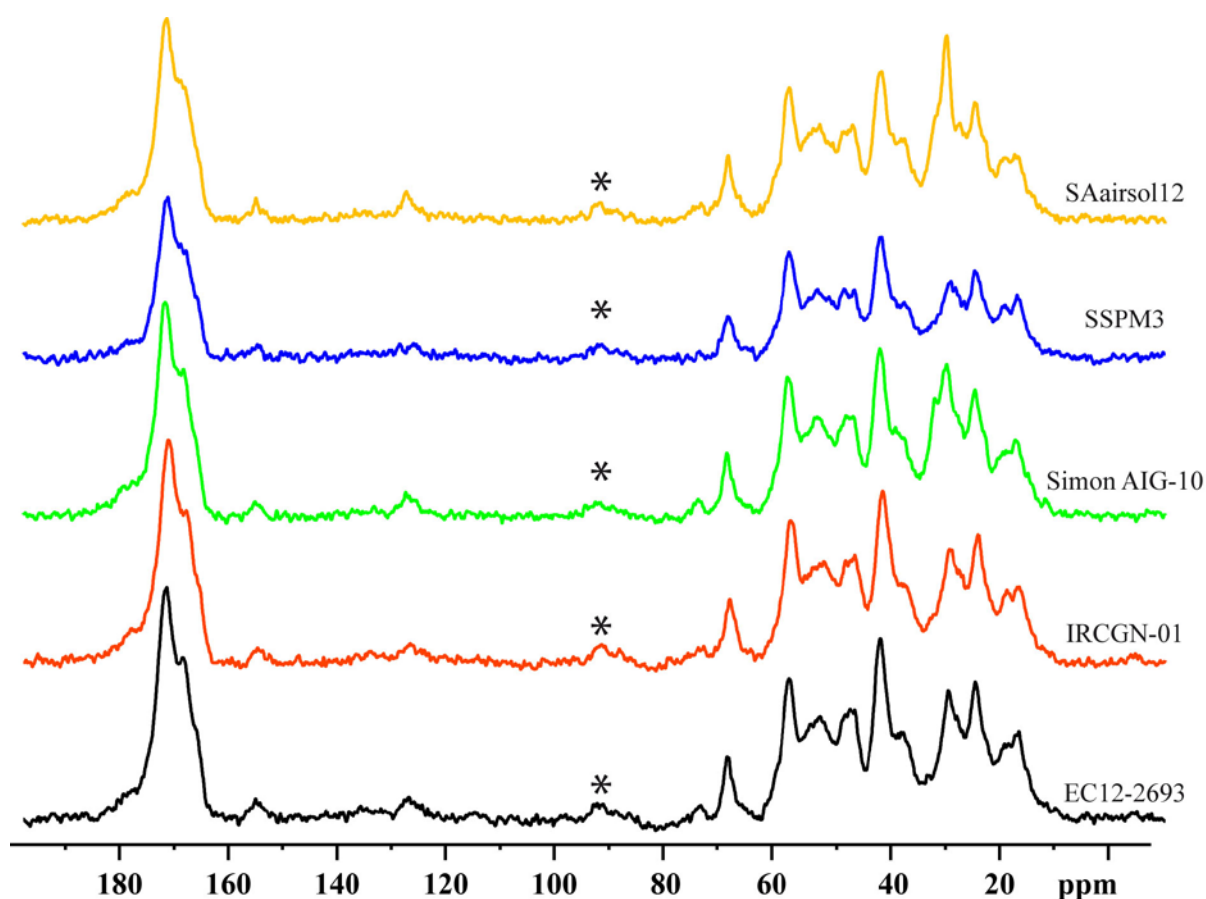


Figure 48 – Spectres RMN du carbone-13 de 5 sujets provenant de milieux de conservation différents et ayant des délais post mortem différents

* : bande de rotation

Informations : masse (EC12-2693) = 118 mg ; masse (IRCGN-01) = 114,8 mg ; masse (Simon AIG-10) = 125,8 mg ; masse (SSPM3) = 115,6 mg ; masse (SAairsol12) = 141,8 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C)

La comparaison des spectres est difficile même si nous notons des différences principalement dans la zone des 30 ppm. La superposition des spectres autorise une comparaison plus aisée (Figure 49).

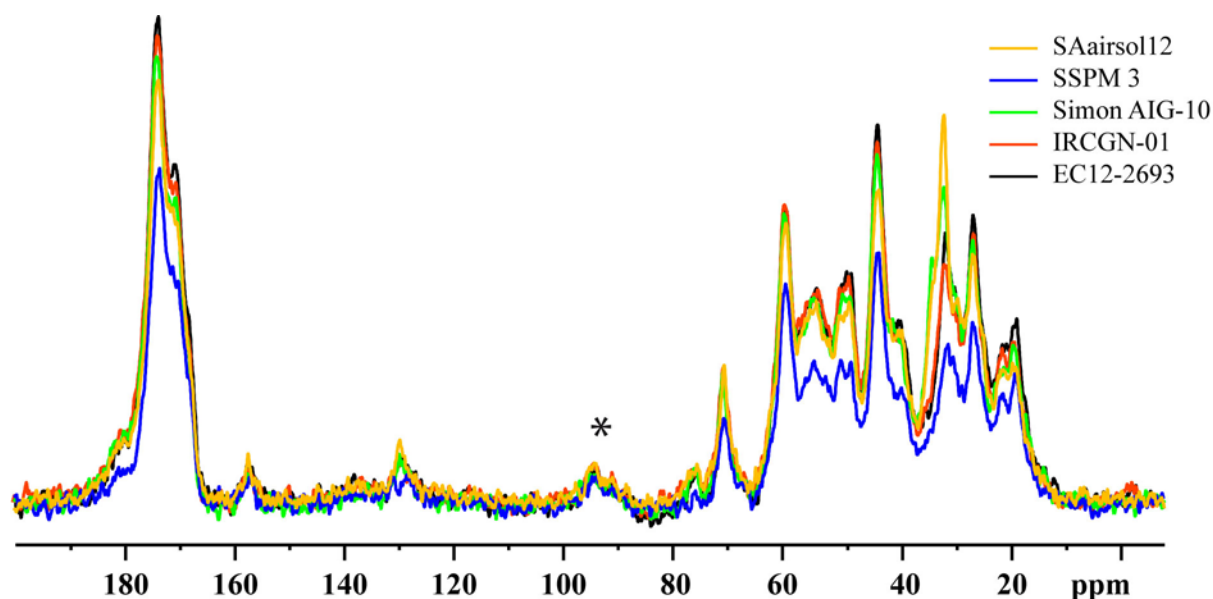


Figure 49 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 de 5 sujets provenant de milieux de conservation différents et ayant des délais post mortem différents

* : bande de rotation

Informations : masse (EC12-2693) = 118 mg ; masse (IRCGN-01) = 114,8 mg ; masse (Simon AIG-10) = 125,8 mg ; masse (SSPM3) = 115,6 mg ; masse (SAairsol12) = 141,8 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C)

Nous constatons que les 5 spectres présentent des profils similaires mais qu'ils ne sont pas superposables. Comme nous l'avons vu précédemment, nous pouvons supposer que ces variations observées sont en partie dues à des masses d'échantillons analysées différentes. Afin de comparer ces échantillons en s'affranchissant de leur masse respective nous les avons normalisés par rapport à une masse équivalente de 100 mg. Les différents rapports applicables à nos échantillons sont donnés dans la Figure 21.

Tableau 22 – Masse analysée et rapport à appliquer pour obtenir une masse de 100 mg pour chaque échantillon utilisé pour tester l'influence de la masse sur les aires et intensités spectrales en RMN du carbone-13

Identifiant	Masse analysée (mg)	Rapport pour 100 mg
EC12-2693	118	0,85
IRCGN-01	114,8	0,87
Simon AIG-10	125,8	0,79
SSPM3	115,6	0,87
SAairsol12	141,8	0,71

Les spectres ainsi normalisés sont présentés dans la Figure 50 et leur superposition dans la Figure 51.

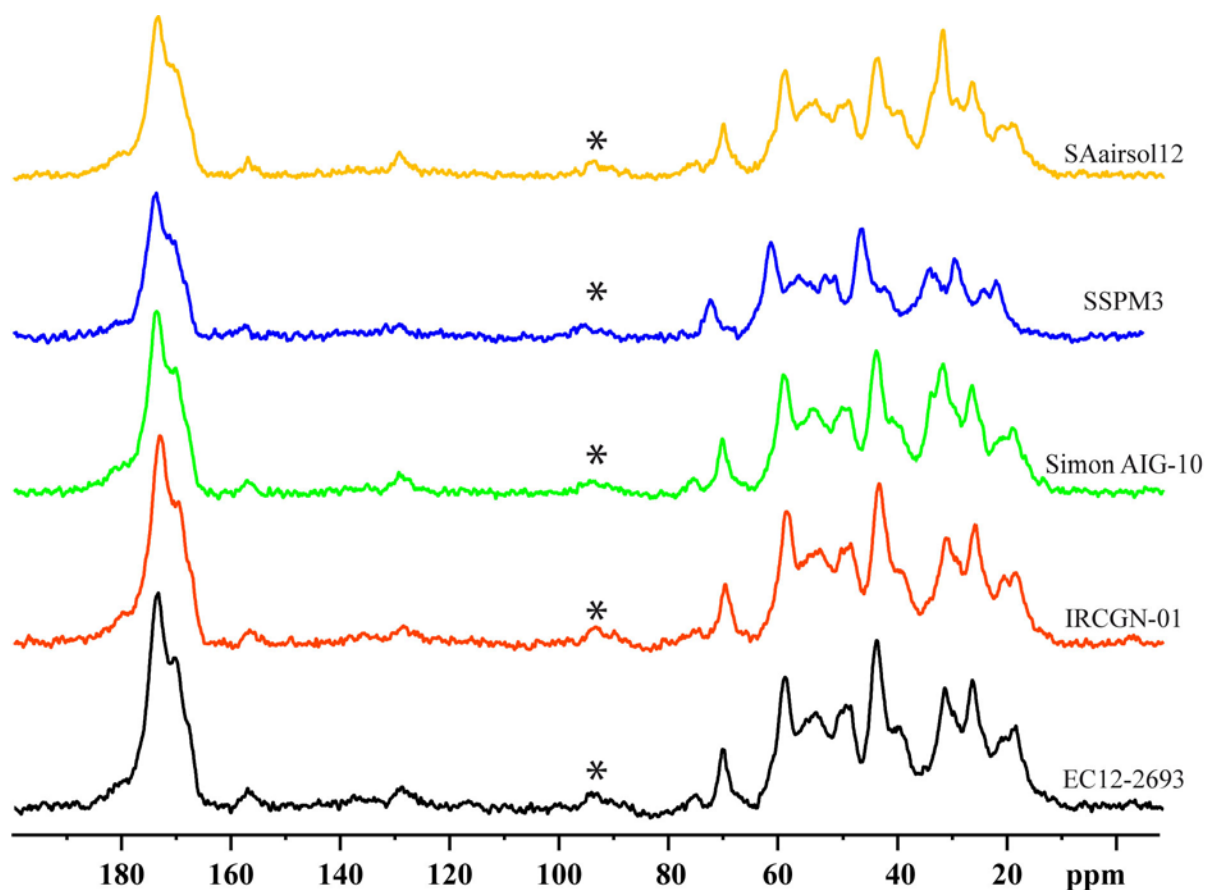


Figure 50 – Spectres RMN du carbone-13 de 5 sujets provenant de milieux de conservation différents et ayant des délais post mortem différents, après normalisation de leur masse à 100 mg

* : bande de rotation

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse de 100 mg : masse initiale (EC12-2693) = 118 mg ; masse initiale (IRCGN-01) = 114,8 mg ; masse initiale (Simon AIG-10) = 125,8 mg ; masse initiale (SSPM3) = 115,6 mg ; masse initiale (SAairsol12) = 141,8 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C)

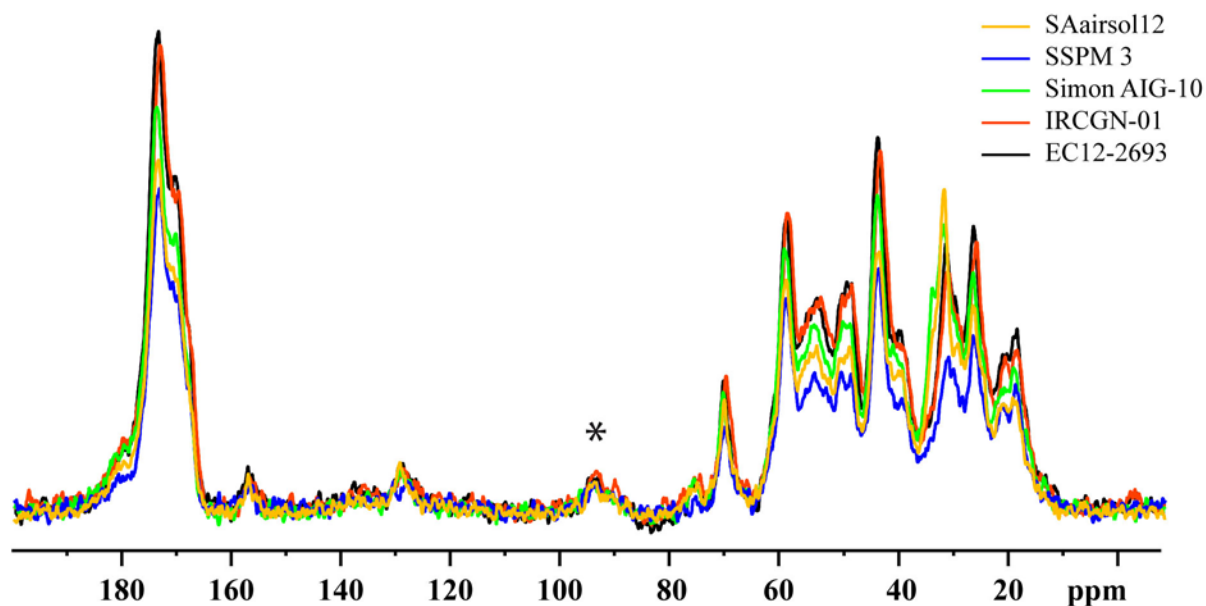


Figure 51 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 de 5 sujets provenant de milieux de conservation différents et ayant des délais post mortem différents, après normalisation de leur masse à 100 mg

* : bande de rotation

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse de 100 mg : masse initiale (EC12-2693) = 118 mg ; masse initiale (IRCGN-01) = 114,8 mg ; masse initiale (Simon AIG-10) = 125,8 mg ; masse initiale (SSPM3) = 115,6 mg ; masse initiale (SAairsol12) = 141,8 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C)

La comparaison des spectres après avoir rapporté leur masse à 100 mg nous montre que les différences initiales que nous observions ne sont pas atténuées, comme nous aurions pu nous y attendre, mais sont accentuées. Il existe donc des variations entre les spectres qui ne peuvent pas être expliquées par les variations de masses d'échantillon analysées. La masse de nos échantillons est donc un paramètre important à prendre en compte afin de pouvoir réaliser des comparaisons pertinentes entre tous nos échantillons et de pouvoir s'assurer que les variations que nous mettons en évidence ne sont pas dues à ce facteur.

4. EFFET DE LA LYOPHILISATION DES ECHANTILLONS SUR LA RESOLUTION SPECTRALE

La comparaison des échantillons en RMN du proton lors de la normalisation de la masse a mis en évidence une influence importante de l'eau sur le profil spectral. La teneur en eau étant propre à chaque échantillon, nous les avons lyophilisés afin d'éliminer l'eau adsorbée et de pouvoir étudier l'effet de la lyophilisation sur nos spectres.

4.1. ANALYSE EN RMN DU PROTON

Nous avons comparé les spectres de 3 échantillons avant et après lyophilisation. Précédemment, nous avons aussi vu que la masse analysée était importante à prendre en compte. Nous avons donc calculé un facteur correctif permettant de prendre en compte la masse analysée mais aussi la teneur en eau de notre échantillon. Nous avons donc pesé notre échantillon avant et après lyophilisation afin de déterminer la teneur en eau mobilisable (adsorbée) de l'échantillon. Nous avons ainsi déterminé la masse sèche analysée de l'échantillon qui a été ramenée à une masse équivalente de 100 mg. Ces différentes étapes nous permettent de calculer un facteur correctif propre à chaque échantillon qui autorise la comparaison de tous les échantillons avec une masse sèche équivalente de 100 mg. Nous avons comparé 3 échantillons humains de différents délais *post mortem* avant et après lyophilisation (Tableau 23).

Tableau 23 – Masse analysée et facteur correctif de chaque échantillon utilisé pour tester l'effet de la lyophilisation sur la résolution spectrale en RMN du proton

Identifiant	Masse analysée (mg)	Teneur en os ^a	Teneur en eau ^b	Masse sèche (mg) ^c	Facteur correctif ^d
EC12-2693	125,6	0,933	0,067	117,2	0,85
EC12-2693 lyoph	123,6	1	0	123,6	0,81
IRCGN-01	112,4	0,916	0,084	103,0	0,97
IRCGN-01 lyoph	115,3	1	0	115,3	0,87
Simon AIG-10	119,7	0,926	0,074	110,8	0,90
Simon AIG-10 lyoph	90,4	1	0	90,4	1,11

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Les spectres proton obtenus après lyophilisation sont présentés dans la Figure 52.

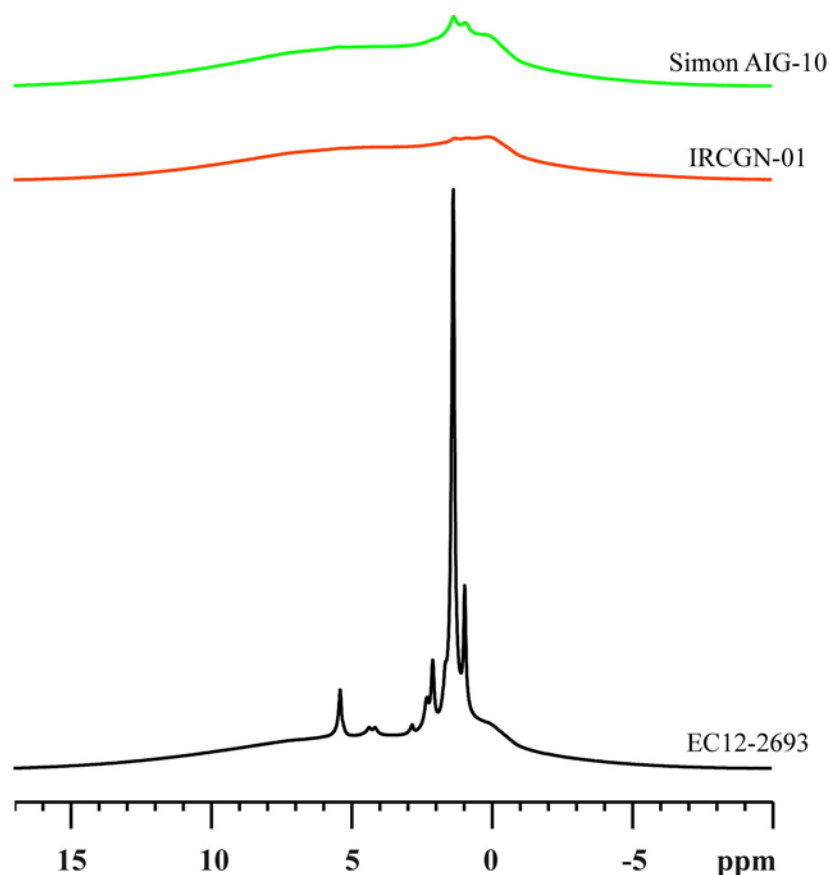


Figure 52 – Spectres RMN du proton de 3 sujets après lyophilisation et après normalisation de leur masse sèche à 100 mg

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; masse sèche (EC12-2693) = 123,6 mg ; masse sèche (IRCGN-01) = 115,3 mg ; masse sèche (Simon AIG-10) = 90,4 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Bien que nous ayons éliminé le signal de l'eau nous constatons que des différences persistent. Les signaux attribuables aux lipides apparaissent sous forme de raies fines et intenses et les signaux attribuables au collagène, dont les protons sont moins mobiles et qui présentent des échanges moléculaires plus lents, apparaissent sous la forme d'un bombement de la ligne de base du spectre. La superposition des spectres facilite la visualisation de ces différences (Figure 53).

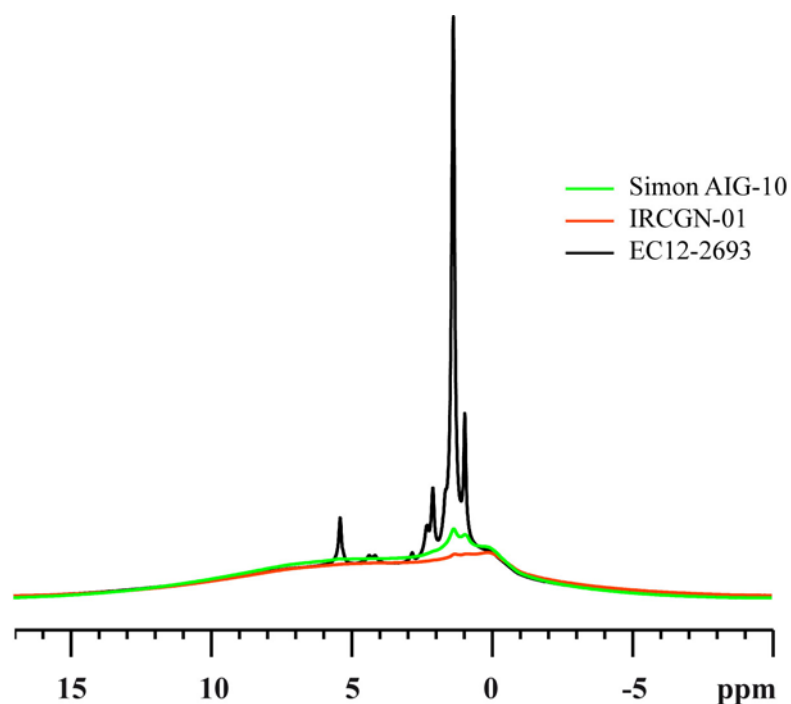


Figure 53 – Superposition des spectres RMN du proton de 3 sujets après lyophilisation et après normalisation de leur masse sèche à 100 mg

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; masse sèche (EC12-2693) = 123,6 mg ; masse sèche (IRCGN-01) = 115,3 mg ; masse sèche (Simon AIG-10) = 90,4 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Malgré la lyophilisation et la normalisation à la masse, des différences existent. Afin de déterminer si la lyophilisation entraîne une diminution de la résolution spectrale, nous avons comparé les spectres de chaque échantillon avant et après lyophilisation. La comparaison pour l'échantillon EC12-2693, qui est un échantillon humain frais, est présentée dans la Figure 54.

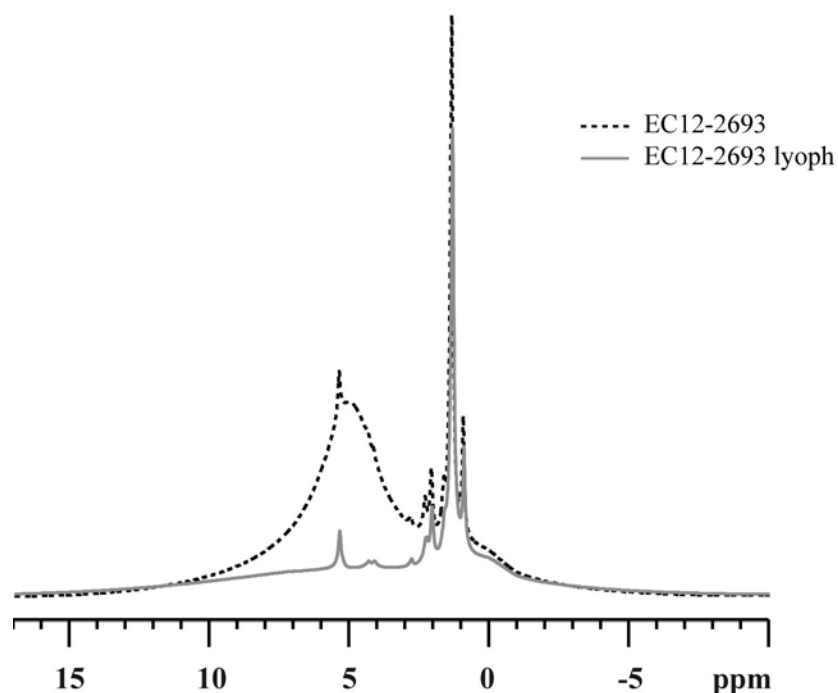


Figure 54 – Superposition des spectres RMN du proton du sujet EC12-2693 avant et après lyophilisation et après normalisation de sa masse sèche à 100 mg

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; masse initiale (EC12-2693) = 125,6 mg ; masse sèche (EC12-2693) = 123,6 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

La lyophilisation de l'échantillon n'altère pas la résolution spectrale et permet même de visualiser plus facilement certaines raies spectrales telles celles résonnant vers 4,20 ppm.

Nous avons réalisé la même comparaison pour deux os plus anciens, IRCGN-01 (Figure 55) et Simon AIG-10 (Figure 56).

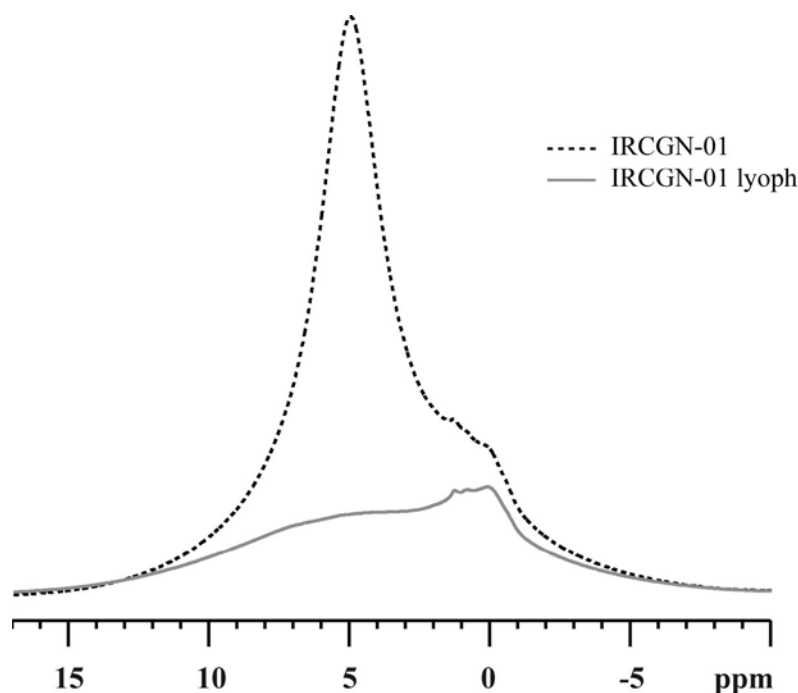


Figure 55 – Superposition des spectres RMN du proton du sujet IRCGN-01 avant et après lyophilisation et après normalisation de sa masse sèche à 100 mg

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; masse initiale (IRCGN-01) = 112,4 mg ; masse sèche (IRCGN-01) = 115,3 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

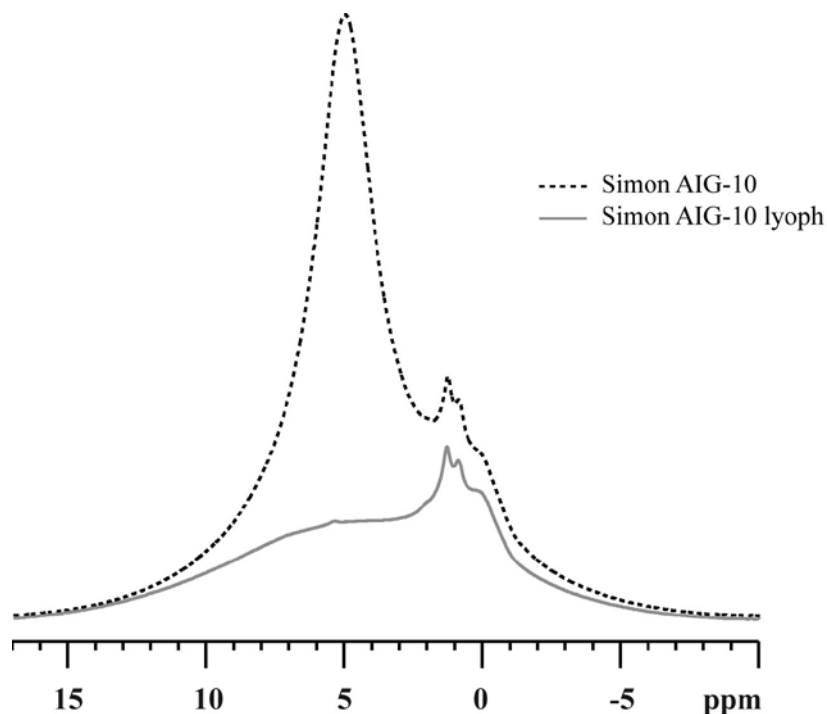


Figure 56 – Superposition des spectres RMN du proton du sujet Simon AIG-10 avant et après lyophilisation et après normalisation de sa masse sèche à 100 mg

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; masse initiale (Simon AIG-10) = 119,7 mg ; masse sèche (Simon AIG-10) = 90,4 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Pour ces deux échantillons, la lyophilisation n'entraîne pas de perte de la résolution. Cependant, on peut noter une diminution de l'intensité spectrale entre les échantillons avant et après lyophilisation. Afin de quantifier cette diminution, nous avons déterminé l'aire spectrale avant et après lyophilisation ainsi que les variations de ces aires (Tableau 24).

Tableau 24 – Variations de l'aire spectrale normalisée par la masse du spectre obtenu avant et après lyophilisation en RMN du proton des échantillons EC12-2693, IRCGN-01 et Simon AIG-10

Identifiant	Facteur correctif (avant/après lyophilisation)	Aire		Variation
		Avant lyophilisation	Après lyophilisation	
EC12-2693	0,85/0,81	0,85	0,37	- 56 %
IRCGN-01	0,97/0,87	0,97	0,33	- 66 %
Simon AIG-10	0,90/1,11	0,90	0,36	- 60 %

La diminution de l'aire spectrale pour les échantillons avant et après lyophilisation correspond à une perte de plus de la moitié du signal. Cette perte est attribuable en partie à la perte du signal de l'eau mais pas uniquement. En effet, cette perte de signal peut être attribuée aussi à des variations du temps de relaxation transversale T_2 . Lors de l'acquisition du signal, il existe un temps court appelé « temps mort » ou DE entre la fin de l'impulsion et le début de l'enregistrement du signal. Ce temps mort, de l'ordre de quelques microsecondes, entraîne une perte de signal pour le début de l'acquisition. Si l'échantillon présente une relaxation transversale T_2 rapide, cette perte de signal sera plus importante comparée à un échantillon présentant une relaxation T_2 plus lente (Figure 57).

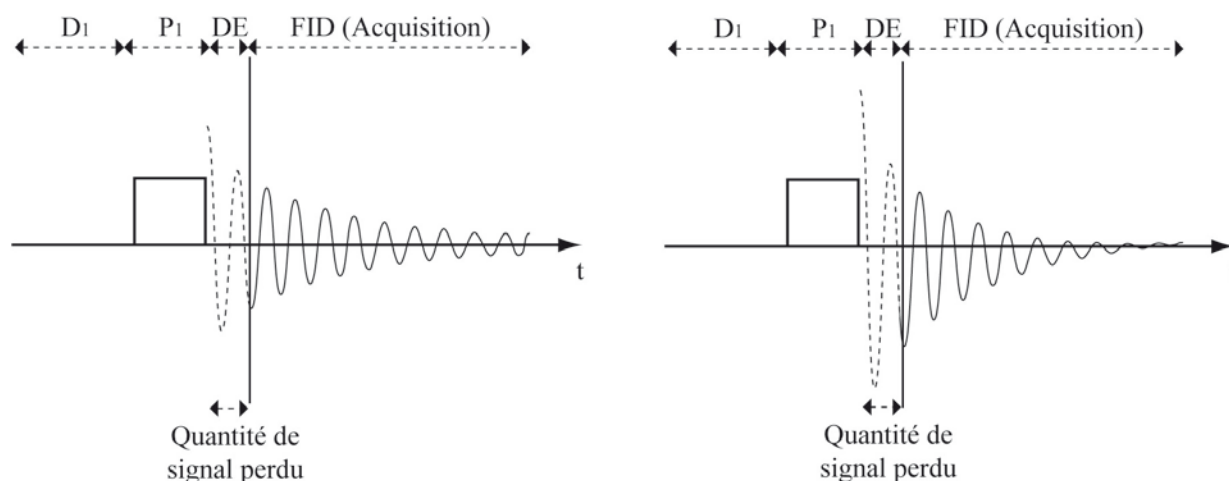


Figure 57 – Séquence d'acquisition expliquant la perte de signal due à un effet de T_2

Cette variation de la vitesse de relaxation transversale T_2 est liée à la présence d'eau dans l'échantillon. Nous observons cependant que les variations d'aires mesurées sont comparables entre ces trois échantillons. Devant l'influence de l'eau sur les profils spectraux et le fait que son effet soit comparable sur les différents échantillons, nous pensons que la lyophilisation des échantillons en RMN du proton est nécessaire et indispensable. Dans la suite de ce travail, nous présenterons donc uniquement les spectres RMN du proton après lyophilisation de l'échantillon et normalisation de sa masse sèche à 100 mg.

4.2. ANALYSE EN RMN DU CARBONE-13

Comme nous venons de le voir, nos échantillons présentent une quantité d'eau intrinsèque qui peut être soit adsorbée, mobile et donc être éliminée par la lyophilisation des échantillons, soit constitutive de la matrice cristalline et donc ne pas être influencée par le processus de lyophilisation. Nous avons voulu déterminer l'influence de cette eau adsorbée sur l'intensité spectrale et la résolution de nos spectres puisque, de par sa mobilité, les protons qui la constituent participent de manière non négligeable au transfert de polarisation que nous utilisons dans le cadre de nos acquisitions en RMN du carbone-13.

Nous avons donc comparé les spectres obtenus avant et après lyophilisation des trois individus précédemment étudiés en RMN du proton et les données de normalisation sont répertoriées dans le Tableau 25 et les spectres sont fournis dans la Figure 58 et Figure 59.

Tableau 25 – Masse analysée et facteur correctif de chaque échantillon utilisé pour tester l'effet de la lyophilisation sur la résolution spectrale en RMN du carbone-13

Identifiant	Masse analysée (mg)	Teneur en os ^a	Teneur en eau ^b	Masse sèche (mg) ^c	Facteur correctif ^d
EC12-2693	118	0,894	0,106	105,5	0,95
EC12-2693 lyoph	123,1	1	0	123,1	0,81
IRCGN-01	114,8	0,903	0,097	103,7	0,96
IRCGN-01 lyoph	114,5	1	0	114,5	0,87
Simon AIG-10	125,8	0,913	0,087	114,9	0,87
Simon AIG-10 lyoph	114,5	1	0	114,5	0,87

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

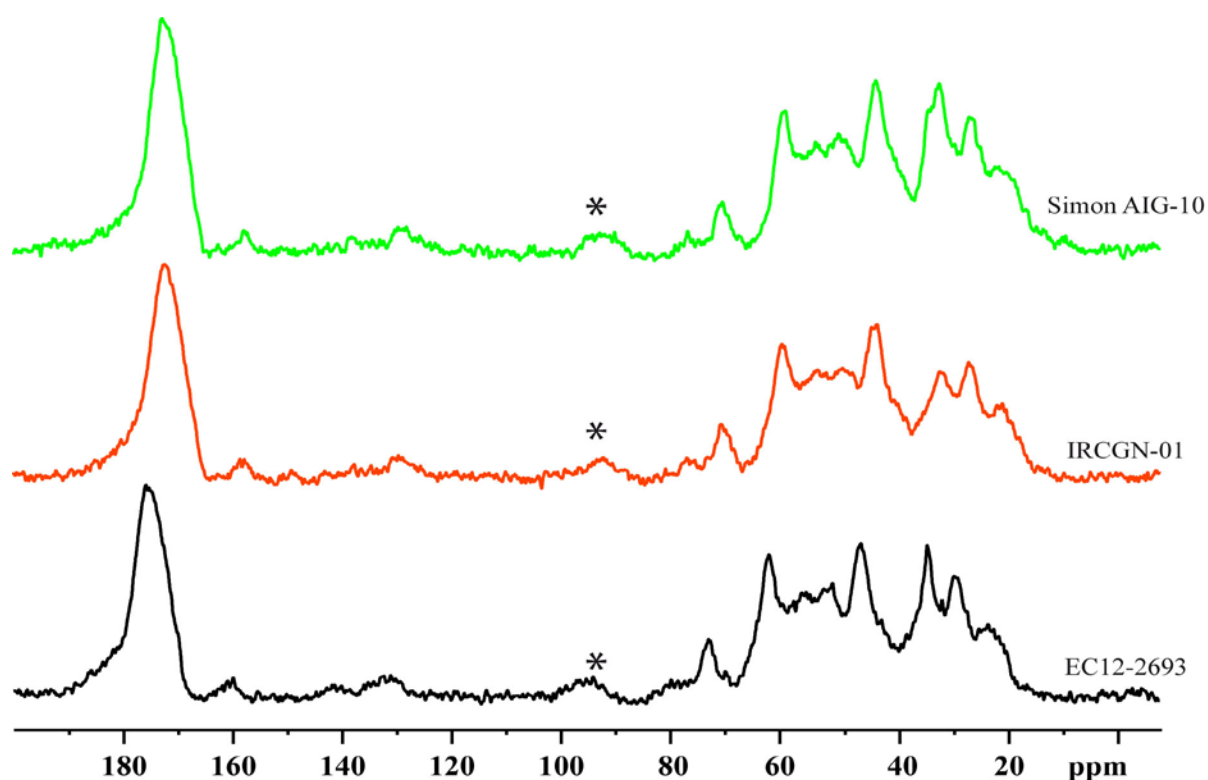


Figure 58 – Spectres RMN du carbone-13 de 3 sujets après lyophilisation et après normalisation de leur masse sèche à 100 mg

* : bande de rotation

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; masse sèche (EC12-2693) = 123,1 mg ; masse sèche (IRCGN-01) = 114,5 mg ; masse sèche (Simon AIG-10) = 114,5 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

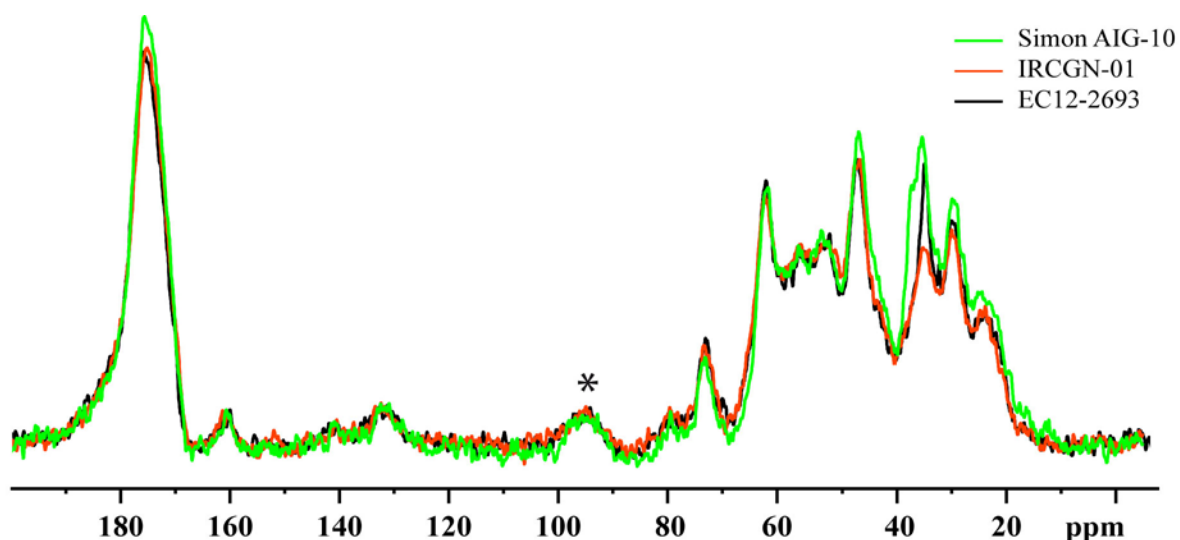


Figure 59 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 de 3 sujets après lyophilisation et après normalisation de leur masse sèche à 100 mg

* : bande de rotation

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; masse sèche (EC12-2693) = 123,1 mg ; masse sèche (IRCGN-01) = 114,5 mg ; masse sèche (Simon AIG-10) = 114,5 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Les profils spectraux des échantillons lyophilisés apparaissent similaires entre eux bien qu'ils présentent des variations d'intensité cependant moins marquées que celles observées sur les échantillons non lyophilisés vus précédemment. Nous avons comparé les spectres avant et après lyophilisation des individus EC12-2693 (Figure 60), IRCGN-01 (Figure 61) et Simon AIG-10 (Figure 62).

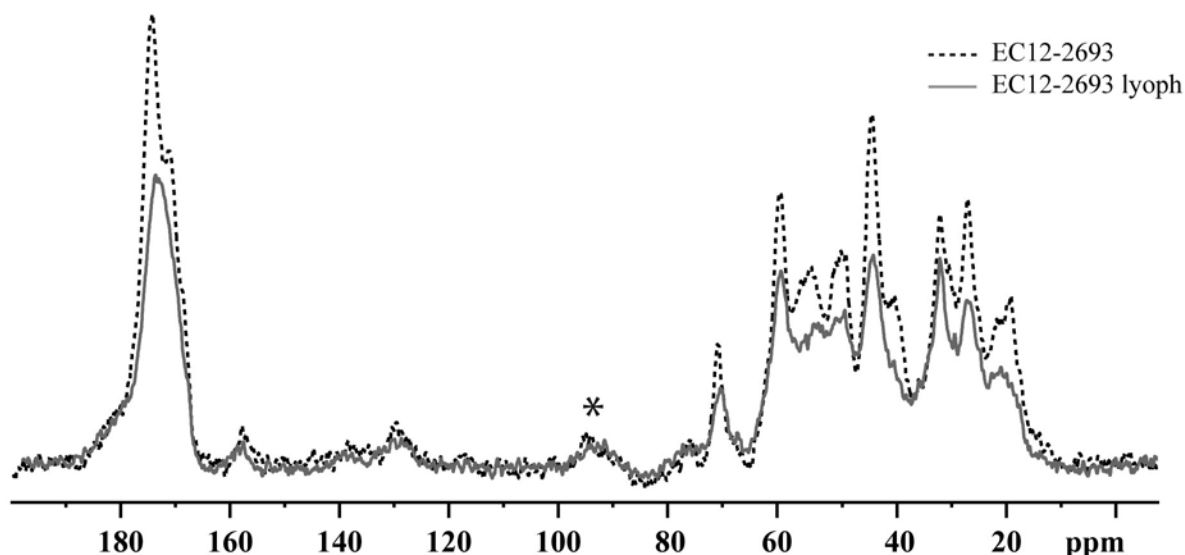


Figure 60 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 du sujet EC12-2693 avant et après lyophilisation et après normalisation de sa masse à 100 mg

* : bande de rotation

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; masse initiale (EC12-2693) = 118 mg ; masse sèche (EC12-2693) = 123,1 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

La comparaison des spectres avant et après lyophilisation montre une diminution de la résolution de l'échantillon lyophilisé comparé à l'échantillon initial pour l'individu EC12-2693. Cette diminution de la résolution est mise en évidence par une moins bonne définition visuelle des pics ainsi qu'une largeur de raie à mi-hauteur plus importante pour le spectre lyophilisé. La superposition des spectres semble même mettre en évidence une diminution globale du signal. Afin de s'en assurer, nous avons réalisé l'intégration des massifs correspondant aux groupes carboxyle (170 – 185 ppm) et aux chaînes aliphatiques (0 – 75 ppm). Les résultats sont présentés dans le Tableau 26.

Tableau 26 – Variations des aires spectrales normalisées par la masse des groupes carboxyle et des chaînes aliphatiques avant et après lyophilisation de l'échantillon EC12-2693

	Facteur correctif	Aire des groupes carboxyle	Aire des chaînes aliphatiques	Ratio aires des chaînes aliphatiques / aire des groupes carboxyle
EC12-2693	Avant lyophilisation			
	0,95	0,95	2,45	2,59
	Après lyophilisation ^a			
	0,81	0,70	1,86	2,66
	Variation après lyophilisation			
		-26 %	-24 %	+3 %

^a Les aires déterminées après lyophilisation sont calibrées à partir de l'aire des groupes carboxyle obtenue avant lyophilisation.

Nous pouvons constater que nous avons une perte de signal à la suite de la lyophilisation de l'échantillon qui est relativement importante pour l'individu EC12-2693 avec une perte de 24 % et de 26 % pour les groupes carboxyle et les chaînes aliphatiques respectivement. Cette perte de signal demeure toutefois homogène entre ces deux groupements chimiques comme l'atteste le peu de variation que nous observons au niveau de leur ratio (3 %).

Nous avons réalisé les mêmes analyses pour l'individu IRCGN-01. Les spectres correspondants sont présentés dans la Figure 61.

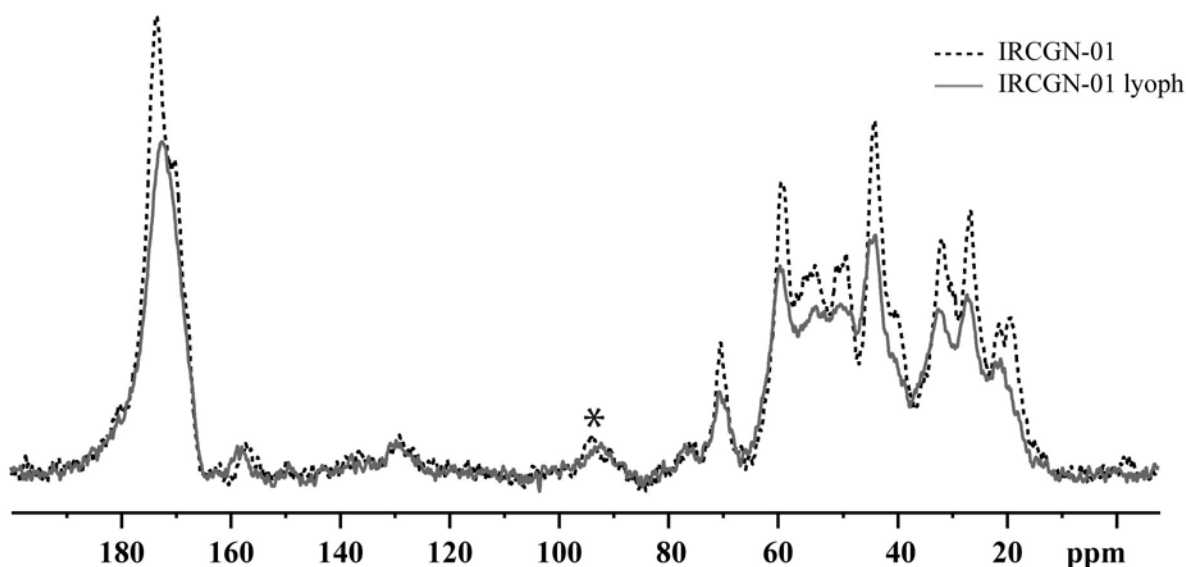


Figure 61 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 du sujet IRCGN-01 avant et après lyophilisation et après normalisation de sa masse à 100 mg

* : bande de rotation

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; masse initiale (IRCGN-01) = 114,8 mg ; masse sèche (IRCGN-01) = 114,5 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Nous constatons ici aussi une diminution de la résolution spectrale pour l'échantillon lyophilisé ainsi qu'une perte globale de l'intensité spectrale (Tableau 31).

Tableau 27 – Variations des aires spectrales normalisées par la masse des groupes carboxyle et des chaînes aliphatiques avant et après lyophilisation de l'échantillon IRCGN-01

	Facteur correctif	Aire des groupes carboxyle	Aire des chaînes aliphatiques	Ratio aires des chaînes aliphatiques / aire des groupes carboxyle
IRCGN-01	Avant lyophilisation			
	0,96	0,96	2,50	2,60
	Après lyophilisation ^a			
	0,87	0,80	2,07	2,59
	Variation après lyophilisation			
		-17 %	-17 %	< 1 %

^a Les aires déterminées après lyophilisation sont calibrées à partir de l'aire des groupes carboxyle obtenue avant lyophilisation.

La diminution de l'intensité spectrale est moins importante pour cet échantillon comparé au précédent et demeure homogène entre les groupes carboxyle et les chaînes aliphatiques. Les spectres du troisième et dernier individu analysé avant et après lyophilisation sont représentés dans la Figure 62.

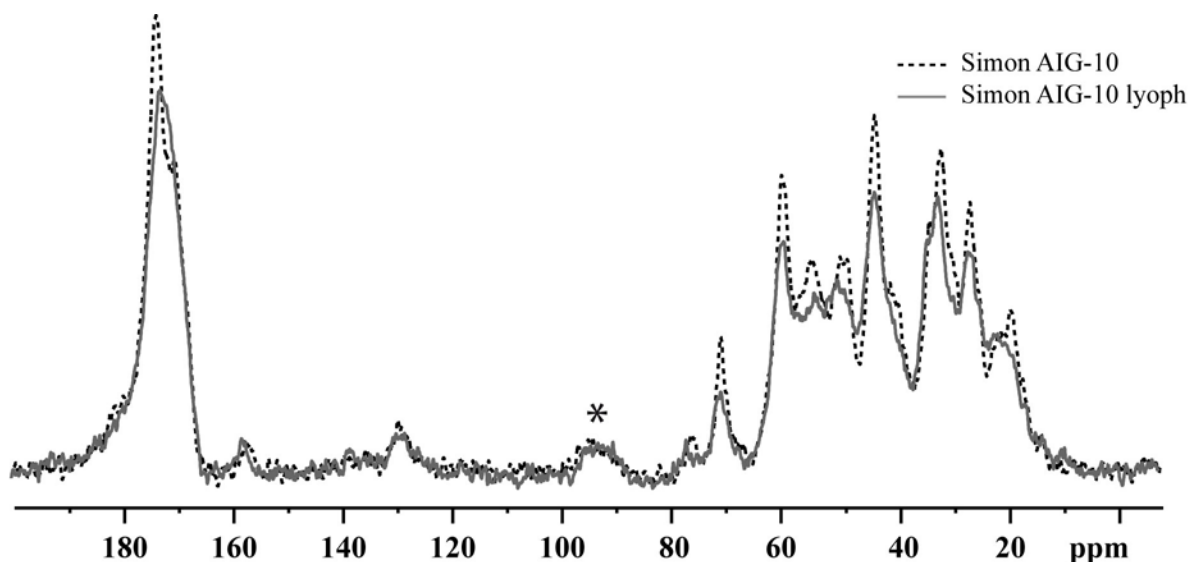


Figure 62 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 du sujet Simon AIG-10 avant et après lyophilisation et après normalisation de sa masse à 100 mg

* : bande de rotation

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; masse initiale (Simon AIG-10) = 125,8 mg ; masse sèche (Simon AIG-10) = 114,5 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Nous constatons ici encore une diminution de la résolution spectrale et une diminution de l'intensité sur l'échantillon lyophilisé cependant cette diminution est de plus faible amplitude que sur les échantillons précédents (Tableau 28).

Tableau 28 – Variations des aires spectrales normalisées par la masse des groupes carboxyle et des chaînes aliphatiques avant et après lyophilisation de l'échantillon Simon AIG-10

	Facteur correctif	Aire des groupes carboxyle	Aire des chaînes aliphatiques	Ratio aires des chaînes aliphatiques / aire des groupes carboxyle
Simon AIG-10	Avant lyophilisation			
	0,87	0,87	2,44	2,80
	Après lyophilisation^a			
	0,87	0,79	2,23	2,82
	Variation après lyophilisation			
		-9 %	-9 %	< 1 %

^a Les aires déterminées après lyophilisation sont calibrées à partir de l'aire des groupes carboxyle obtenue avant lyophilisation.

Nous constatons que pour les spectres obtenus en RMN du carbone-13, la lyophilisation entraîne une perte de résolution spectrale et une perte de signal. La perte de résolution s'explique par l'effet de l'élimination de l'eau adsorbée (mobile) qui ralentit la vitesse d'échange des protons au sein du collagène. Concernant la perte de signal, il s'agit ici aussi d'un effet de la relaxation transversale T_2 (Figure 57 page 185). Nous pouvons de plus noter que cette perte de signal n'est pas constante entre les 3 échantillons et qu'elle semble être plus importante avec l'ancienneté du décès de l'individu (EC12-2693 > IRCGN-01 > Simon AIG-10).

La lyophilisation entraîne deux effets principaux sur les spectres RMN du carbone-13 : une diminution de la résolution spectrale et une diminution du signal. Nous avons donc décidé de réaliser nos acquisitions en RMN du carbone-13 avant lyophilisation mais les interprétations se feront après normalisation de la masse à une masse sèche équivalente de 100 mg.

Nous pouvons maintenant comparer nos 5 échantillons initialement utilisés pour tester l'effet de la masse sur nos spectres en leur appliquant un facteur correctif qui leur est propre et qui tient compte, pour la RMN du carbone-13, de l'effet de la masse et de la lyophilisation (Tableau 29).

Tableau 29 – Calcul du facteur correctif permettant de normaliser les échantillons à une masse théorique analysée de 100 mg

Identifiant	Masses analysée (mg)	Teneur en os ^a	Teneur en eau ^b	Masses sèche (mg) ^c	Facteur correctif ^d
EC12-2693	118	0,894	0,106	105,5	0,95
IRCGN-01	114,8	0,903	0,097	103,7	0,96
Simon AIG-10	125,8	0,913	0,087	114,9	0,87
SSPM3	115,6	0,939	0,061	108,5	0,92
SAairsol12	141,8	0,876	0,124	124,2	0,81

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Nous avons ensuite appliqué ces facteurs correctifs aux intensités spectrales de nos échantillons et nous avons comparé à nouveau ces spectres (Figure 63 et Figure 64).

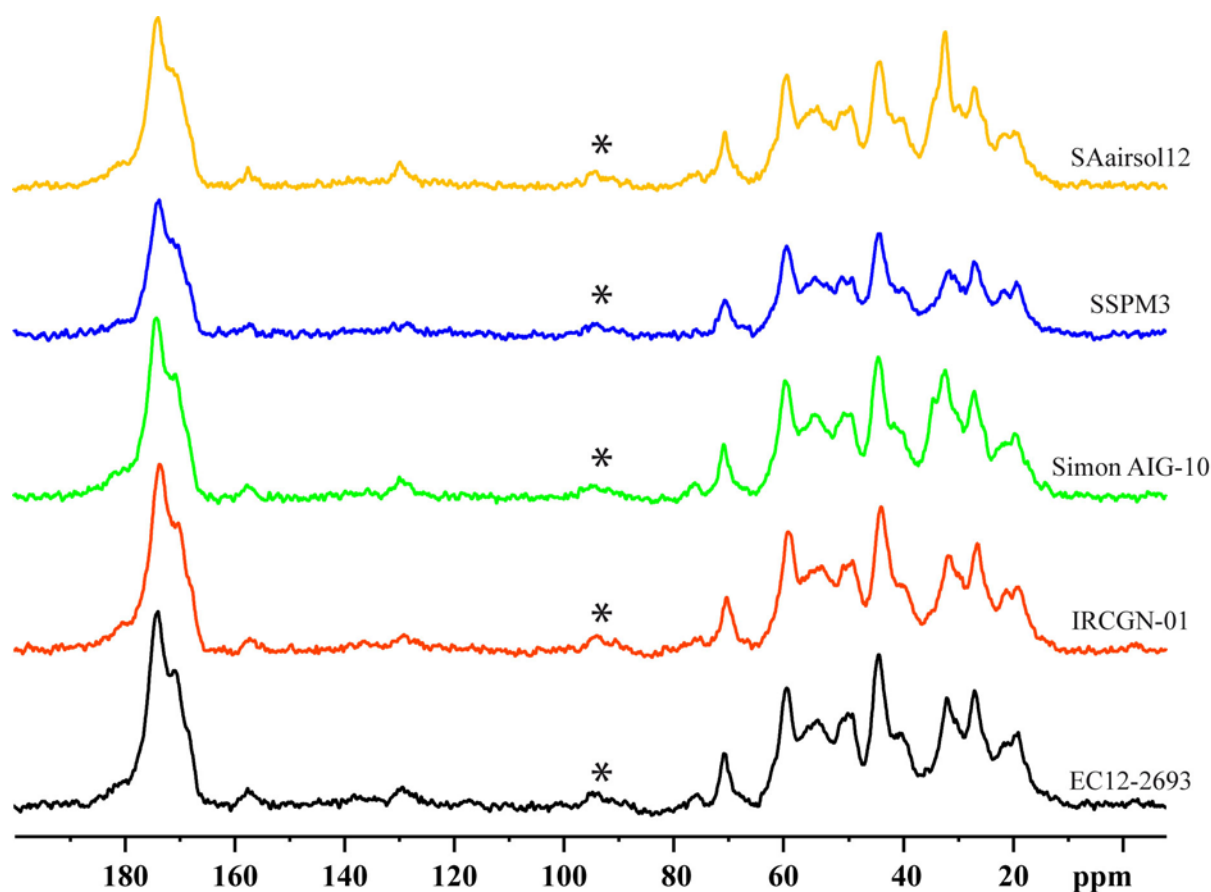


Figure 63 – Spectres RMN du carbone-13 de 5 sujets provenant de milieux de conservation différents et ayant des délais post mortem différents, après normalisation de leur masse à 100 mg

* : bande de rotation

Informations : masse initiale (EC12-2693) = 118 mg ; masse initiale (IRCGN-01) = 114,8 mg ; masse initiale (Simon AIG-10) = 125,8 mg ; masse initiale (SSPM3) = 115,6 mg ; masse initiale (SAairsol12) = 141,8 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

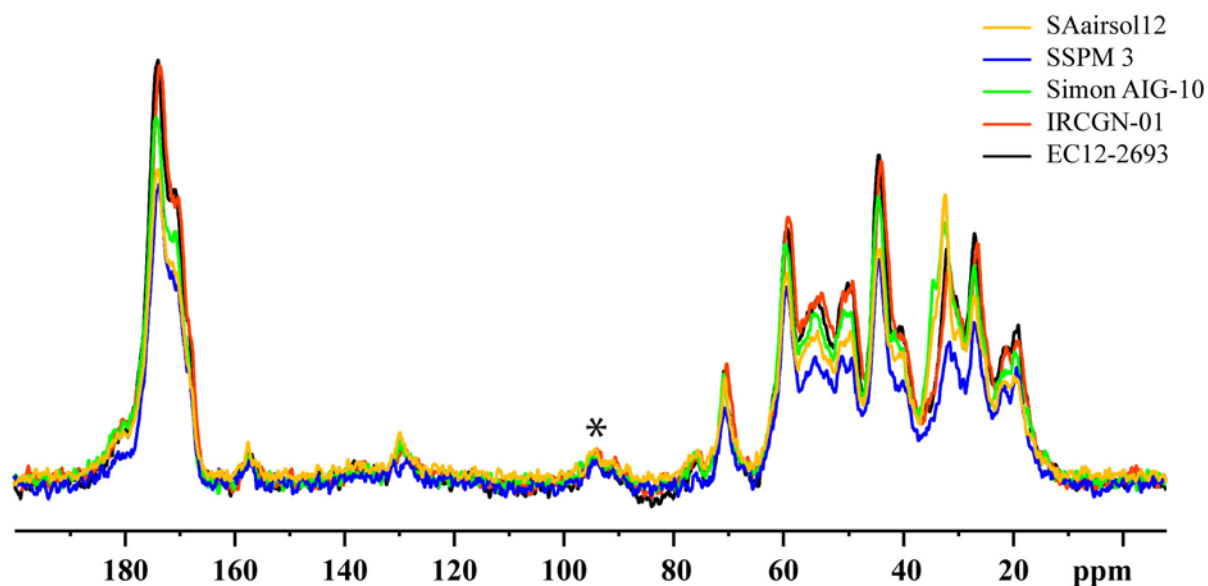


Figure 64 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 de 5 sujets provenant de milieux de conservation différents et ayant des délais post mortem différents, après normalisation de leur masse à 100 mg

* : bande de rotation

Informations : masse initiale (EC12-2693) = 118 mg ; masse initiale (IRCGN-01) = 114,8 mg ; masse initiale (Simon AIG-10) = 125,8 mg ; masse initiale (SSPM3) = 115,6 mg ; masse initiale (SAairsol12) = 141,8 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Nous constatons que des différences persistent mais notre démarche analytique nous permet d'attester qu'elles ne sont pas dues à la masse ou à la teneur en eau de l'échantillon. Elles relèvent donc d'autres paramètres que nous verrons par la suite.

5. OPTIMISATION DES PARAMETRES D'ACQUISITION EN RMN DES SOLIDES DU CARBONE-13

5.1. OPTIMISATION DU DELAI DE RETOUR A L'EQUILIBRE DE L'AIMANTATION D_1 ENTRE DEUX ACQUISITIONS

Le délai de retour à l'équilibre de l'aimantation D_1 est dépendant du temps de relaxation longitudinale T_1 qui est lui-même dépendant de la molécule étudiée. Le retour à l'équilibre n'est pas synchrone pour tous les atomes de la molécule donc le T_1 choisi est généralement le plus long. Classiquement, afin de s'assurer que tous les noyaux sont retournés à l'état d'équilibre avant l'application d'une nouvelle impulsion, on détermine D_1 comme suit :

$$D_1 = 5 \times T_1 \quad [12]$$

Au cours d'une acquisition RMN, le signal enregistré ne concerne que celui de la relaxation transversale T_2 (FID). Nous ne pouvons pas accéder directement aux variations du signal en fonction de la relaxation longitudinale. Afin de déterminer T_1 , nous avons utilisé une séquence dite d'« Inversion Récupération ». Cette séquence permet d'explorer la cinétique de retour à l'équilibre. Elle consiste en l'application d'une première impulsion permettant de basculer l'aimantation selon une orientation de 180° , puis après un délai appelé Temps d'Inversion (TI), une seconde impulsion est appliquée basculant cette fois l'aimantation de 90° afin de permettre sa détection. Le principe est de faire varier le TI ; pour des TI courts, le signal apparaît négatif, puis il s'annule avant de devenir positif. Le passage à zéro se fait au temps $TI = T_1 \ln 2$ ce qui permet donc de déterminer le T_1 du groupe chimique considéré. On peut aussi paramétrer la courbe selon l'équation et déterminer T_1 (Figure 65).

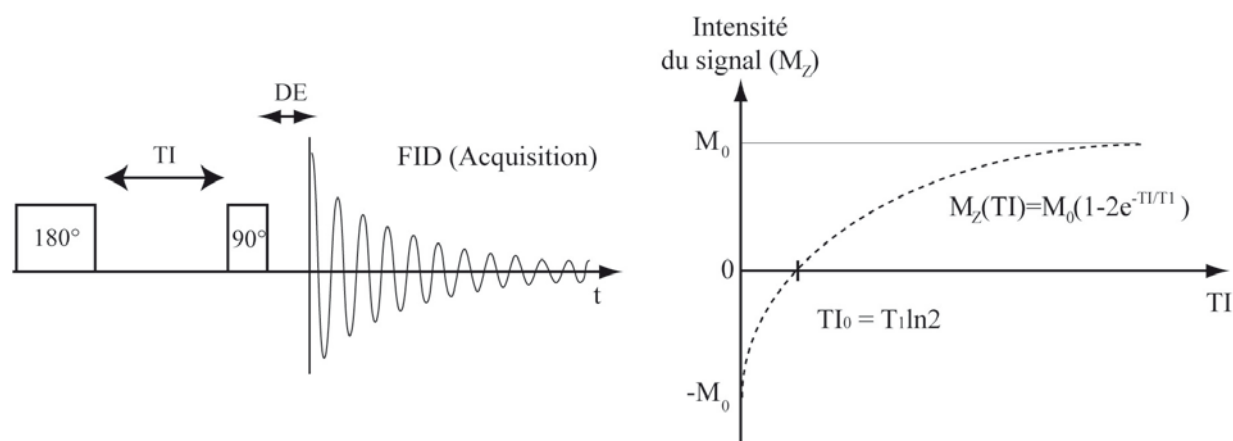


Figure 65 – Séquence d'Inversion Récupération permettant la détermination du délai de retour à l'équilibre de l'aimantation D_1 à l'aide de l'équation de retour à l'équilibre

Nous avons effectué cette optimisation sur les atomes d'hydrogène d'un échantillon osseux humain, IRCGNc-#6/2003 (100 mg d'os), et pour 5 pics de résonance. Les T_1 obtenus varient entre 531 et 889 ms et, afin de déterminer notre délai D_1 , nous avons utilisé le temps le plus long (889 ms) et nous avons arrondi notre valeur ($0,889 \times 5 = 4,445$ s) à la seconde supérieure c'est-à-dire $D_1 = 5$ s. C'est cette valeur de D_1 que nous avons utilisé lors de nos acquisitions en RMN du proton.

Les séquences que nous employons en RMN du carbone-13 et du phosphore-31 sont des séquences CPMAS avec un transfert de polarisation des protons vers les atomes de carbone-13 ou de phosphore-31. Le délai de retour à l'équilibre de l'aimantation correspond donc à celui du proton c'est-à-dire 5 s.

5.2. OPTIMISATION DU TEMPS DE CONTACT T_c

5.2.1. Principe

Le carbone-13 étant peu abondant naturellement, sa détection en RMN des solides nécessite un transfert de magnétisation des protons vers les atomes de carbone. Ce transfert de magnétisation sera donc différent en fonction de la proximité et du nombre d'atomes d'hydrogène liés au carbone. Ainsi, on comprend que le transfert de magnétisation sera plus long au sein des groupements carboxyle COOH car le proton n'est pas directement lié au carbone, il en est donc plus éloigné. Inversement, au sein de la chaîne aliphatique des acides aminés, les carbones portent un à trois protons, le transfert de magnétisation est donc plus efficace car les protons sont beaucoup plus proches du carbone. Cependant le transfert de polarisation se déroule parallèlement à un autre phénomène, la relaxation, qui va entraîner une diminution de l'intensité du signal et qui débutera plus tôt pour les carbones ayant des protons qui lui sont directement liés (Figure 66). Ainsi, que ce soit à cause d'une relaxation rapide due à la présence d'un grand nombre de protons ou que ce soit d'un transfert de magnétisation moins efficace relatif à l'absence de proton directement lié au carbone, nous observons une perte de signal qu'il convient de réduire au maximum en choisissant un temps de contact adéquat.

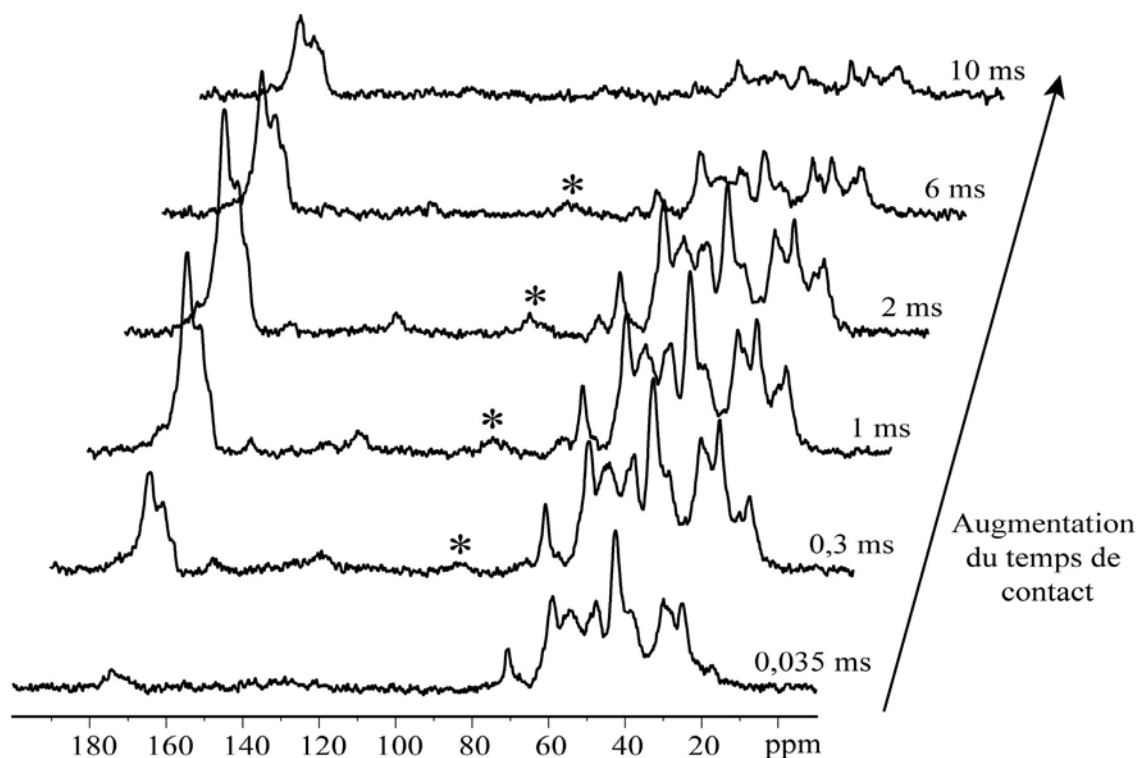


Figure 66 – Exemple de variation de l'intensité spectrale en fonction du temps de contact d'un échantillon osseux en RMN du carbone-13

* : bande de rotation

Informations : échantillon EC12-2652 ; masse = 123,7 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; τ_c de 35 μ s, 300 μ s ; 1 ms ; 2 ms ; 6 ms et 10 ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Les acquisitions RMN des solides en carbone-13 demandent donc un temps de contact qui soit adapté à ces groupements. Il faut donc déterminer quel est le temps de contact optimal pour les groupements carboxyle, le temps de contact optimal pour les chaînes aliphatiques, et choisir un temps de contact – compromis entre ces deux valeurs – permettant une acquisition optimisée de l'ensemble de l'échantillon.

5.2.2. Protocole

Afin de déterminer le temps de contact optimal pour l'étude d'échantillons osseux, nous avons réalisé des acquisitions dans les mêmes conditions, en ne faisant varier que le temps de contact τ_c . La séquence utilisée est une séquence CPMAS avec 2 560 acquisitions, un D_1 de 5 s, et un temps de contact τ_c variant de 0,035 ms à 10 ms selon 13 valeurs (0,035 ; 0,07 ; 0,15 ; 0,3 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 et 10 ms). Pour chaque temps de contact, nous avons quantifié le signal enregistré que ce soit en termes d'intensité de pic ou d'aire sous les pics (Figure 67).

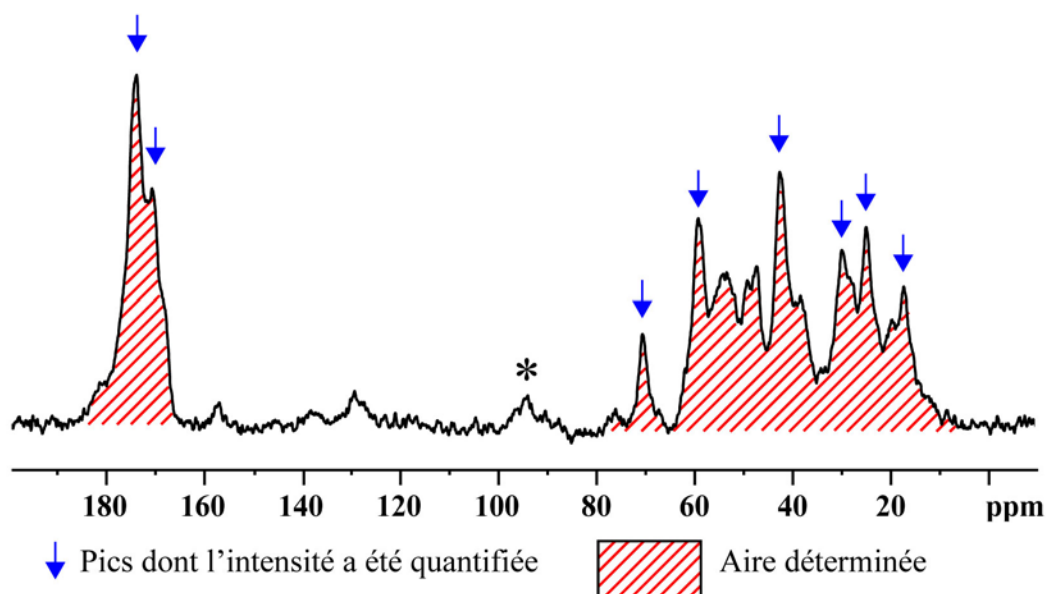


Figure 67 – Paramètres quantifiés en vue de l'optimisation de la séquence d'acquisition CPMAS en RMN du carbone-13 sur un échantillon osseux

* : bande de rotation

Informations : échantillon EC12-2652 ; masse = 123,7 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; D_1 = 5 s ; P_1 = 2,85 μ s ; τ_c = 1,5 ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Les pics sélectionnés pour l'estimation de l'intensité maximale du spectre correspondent à ceux provenant des principaux acides aminés contenus dans le collagène de type I à savoir essentiellement la glycine, l'alanine, la proline et l'hydroxyproline. Ils se séparent en deux massifs distincts : le premier compris entre 0 et 75 ppm correspondant essentiellement aux

chaînes latérales (aliphatiques) des acides aminés et le second, entre 170 et 185 ppm, correspondant essentiellement aux groupements carboxyle COOH de ces mêmes acides aminés. Concernant la quantification de l'aire sous le spectre, nous avons intégré les deux précédents massifs définis (calcul de la surface délimitée par le tracé du spectre). Les déplacements chimiques et les groupes fonctionnels concerné sont donnés dans le Tableau 30.

Tableau 30 – Gamme de déplacements chimiques et attribution des pics de résonance utilisés pour l'optimisation du temps de contact τ_c en RMN CPMAS du carbone-13

	Gamme de déplacements chimiques (ppm)	Attribution
Aire	170 – 185	Groupes carboxyle
	0 – 75	Chaîne aliphatique
Intensité	173	Groupe carboxyle 1
	170	Groupe carboxyle 2
	70,1 – 70,8	C γ Hyp
	58,2 – 59,7	C α Pro et C α Hyp
	42,7 – 43,3	C α Gly
	29,1 – 30,5	C β Pro
	24,1 – 25,2	C γ Pro
	16,4 – 18,8	C β Ala

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; τ_c variant de 35 μ s à 10 ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Les intensités et les aires spectrales ont été déterminées pour les treize temps de contact choisis et sur différents échantillons osseux à savoir des os humains et animaux (*Sus scrofa*), de différents délais *post mortem* et provenant de milieux de conservation différents (frais, pleine terre, air libre, cercueil, catacombe). Ces échantillons constituant notre base de référence pour l'optimisation du temps de contact ont été choisis de façon à explorer quasiment toutes les conditions de conservation que nous retrouvons au sein de notre corpus total. Cela nous permet ainsi de choisir un temps de contact optimal pour le tissu osseux au sens générique du terme. Ces aires et intensités ont été normalisées entre elles afin de pouvoir comparer les différents échantillons entre eux.

5.2.3. Résultats

Nous avons réalisé les courbes d'accumulation (variation de l'intensité ou aire spectrale en fonction du temps de contact) sur 13 échantillons différents appartenant à notre corpus d'échantillon. Pour trois échantillons, nous avons réalisé l'optimisation avant et après lyophilisation (Tableau 31).

Tableau 31 – Échantillons utilisés pour l'optimisation du temps de contact τ_c en RMN des solides du carbone-13

Identifiant	Nature	Délai <i>post mortem</i> (années)	Mode de conservation	Lyophilisation
EC12-2693	Humain	0	Frais ^a	Oui
EC12-2502	Humain	0	Frais ^a	Non
EC12-2652	Humain	0	Frais ^a	Non
EC12-2673	Humain	0	Frais ^a	Non
IRCGN-01	Humain	≈ 15	Pleine terre ^b	Oui
IRCGN-02	Humain	≈ 30	Pleine terre ^b	Non
Simon AIG-10	Humain	58	Cercueil en pleine terre ^c	Oui
SB3	Humain	≈ 200	Cercueil en pleine terre ^d	Non
SSPM3	Humain	≈ 2000	Catacombe ^e	Non
VAL12-11-22	Animal	0	Frais ^f	Non
SAairair12	Animal	1	Air libre ^g	Non
SAairsol12	Animal	1	Air libre ^g	Non
SAterre12	Animal	1	Pleine terre ^h	Non
Nombre d'échantillons = 13				
Nombre d'optimisations réalisées = 16				

^a Sujets frais conservés par le froid à l'École de Chirurgie de Paris (France) ; ^b Sujets inhumés en pleine terre conservés à l'IRCGN (Rosny-sous-Bois, France) ; ^c Sujet provenant de la désaffectation d'un cimetière, collection Simon (Genève, Suisse) ; ^d Sujet archéologique provenant du cimetière Saint-Benoît (Prague, République tchèque) ; ^e Sujet archéologique provenant de la catacombe des Saints Pierre et Marcelin (Rome, Italie) ; ^f Échantillon de *Sus scrofa* frais provenant d'une boucherie (Bordeaux, France) ; ^g Échantillon de *Sus scrofa* déposé à même le sol, sur une terre végétale (Saint-Avit, France) ; ^h Échantillon de *Sus scrofa* enterré à 30 cm de profondeur dans un sol sableux recouvert de terre végétale (Saint-Avit, France).

Les résultats seront présentés de façon détaillée pour un premier échantillon (EC12-2693) afin d'illustrer la démarche, puis nous synthétiserons les résultats obtenus sur les échantillons suivants.

5.2.3.1. Résultats de l'optimisation sur un os récent

Pour chaque échantillon (ici EC12-2693), nous avons réalisé l'accumulation de 13 spectres correspondant chacun à un temps de contact différent. Pour chaque spectre nous avons déterminé l'intensité spectrale maximale pour deux des pics correspondant aux groupements carboxyle du collagène et six des pics correspondant à différents carbones de la chaîne aliphatique. De même, nous avons déterminé l'aire spectrale de ces deux massifs (cf. Tableau 30).

5.2.3.1.1. Utilisation des variations d'intensité des pics

Les atomes de carbone de la chaîne aliphatique et ceux des groupes carboxyle des acides aminés se comportent de manière similaire lors de l'augmentation du temps de contact (Figure 68 et Figure 69). Nous observons une augmentation de l'intensité spectrale avec l'augmentation du temps de contact, puis une phase plus ou moins marquée de « plateau » où l'intensité varie

assez peu, et enfin une phase plus lente de décroissance de l'intensité avec les temps de contact les plus longs. Nous constatons néanmoins que l'atteinte du maximum de l'intensité spectrale se fait à des temps de contact différents entre différents pics des chaînes aliphatiques et ceux des groupes carboxyle ce qui confirme bien que le transfert de polarisation n'est pas synchrone pour ces deux groupements chimiques.

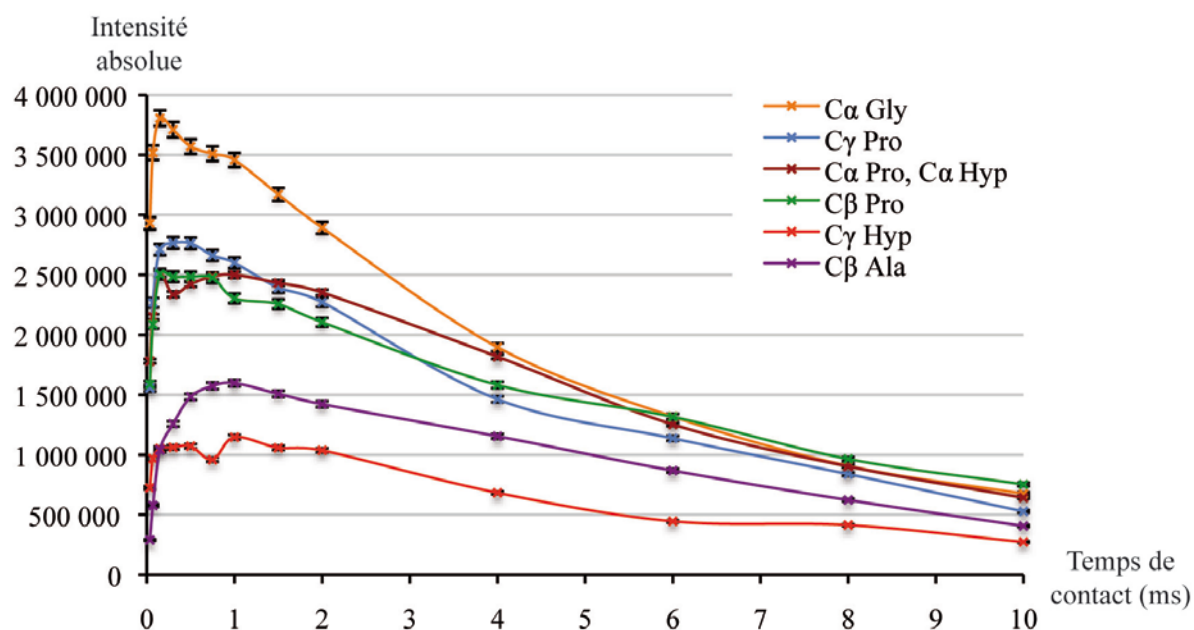


Figure 68 – Variation de l'intensité spectrale des différents pics des chaînes aliphatiques utilisés pour l'optimisation du temps de contact sur l'échantillon EC12-2693, en fonction du temps de contact, en valeur absolue

Informations : pics définis dans la Figure 67 et attribués dans le Tableau 30 ; intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$; les points sont reliés entre eux afin d'aider à la visualisation de la variation.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; τ_c variant de 35 μ s à 10 ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Si nous regardons plus en détail le comportement des atomes de carbone des différents acides aminés du collagène, nous constatons que la valeur absolue des intensités spectrales maximales est différente entre les différents acides aminés (Figure 68). Ceci est à mettre en relation avec la proportion relative de chaque acide aminé au sein de la molécule de collagène (la glycine est l'acide aminé le plus abondant dans le collagène), mais aussi avec le nombre d'atomes d'hydrogène portés par le carbone considéré (cf. Tableau 1 page 40). Nous observons la même chose avec les deux groupes carboxyle choisis pour l'optimisation, les valeurs maximales d'intensité diffèrent (Figure 69).

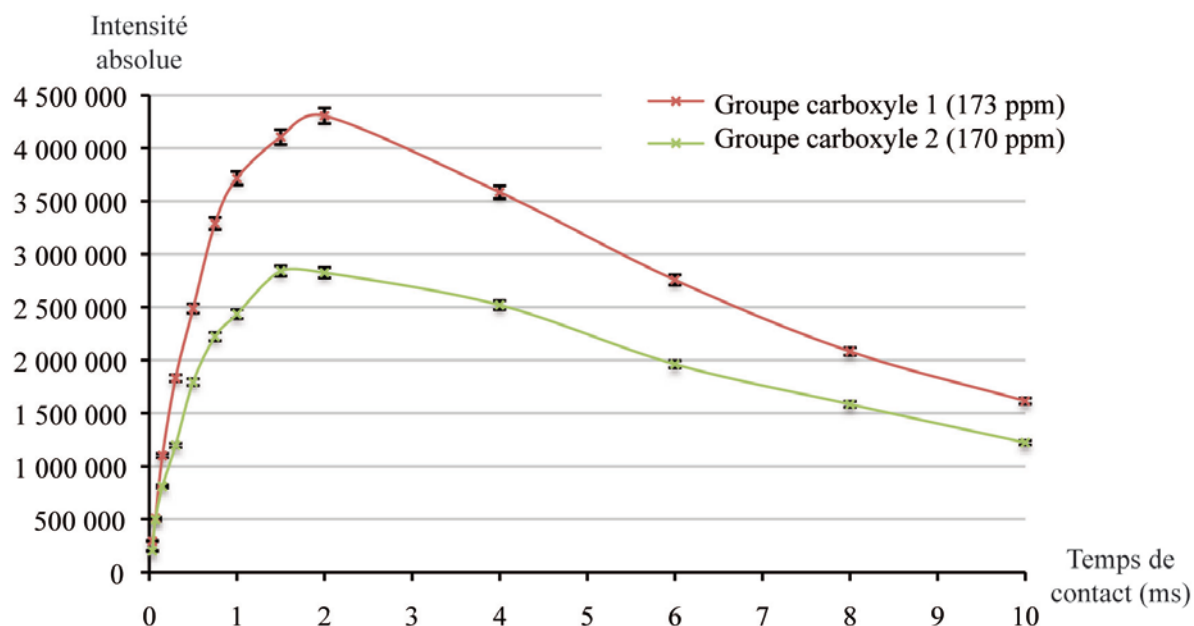


Figure 69 – Variation de l'intensité spectrale des différents pics des groupes carboxyle utilisés pour l'optimisation du temps de contact sur l'échantillon EC12-2693, en fonction du temps de contact, en valeur absolue

Informations : pics définis dans la Figure 67 et attribués dans le Tableau 30 ; intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$; les points sont reliés entre eux afin d'aider à la visualisation de la variation.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; τ_c variant de 35 μ s à 10 ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Afin de pouvoir comparer le comportement de tous les groupes chimiques possédant un atome de carbone, indépendamment de leur abondance au sein du tissu osseux, nous avons normalisé les valeurs des intensités entre elles. Pour cela, la plus grande intensité déterminée pour chaque pic sélectionné représente la valeur maximale 1 et toutes les autres intensités sont calculées relativement à celle-ci. Cette démarche nous permet aussi bien de comparer les pics issus d'un même échantillon mais nous permettra aussi par la suite une comparaison plus aisée des différents échantillons entre eux.

Les résultats après normalisation concernant les chaînes aliphatiques sont illustrés dans la Figure 70 et ceux concernant les groupes carboxyle le sont dans la Figure 71.

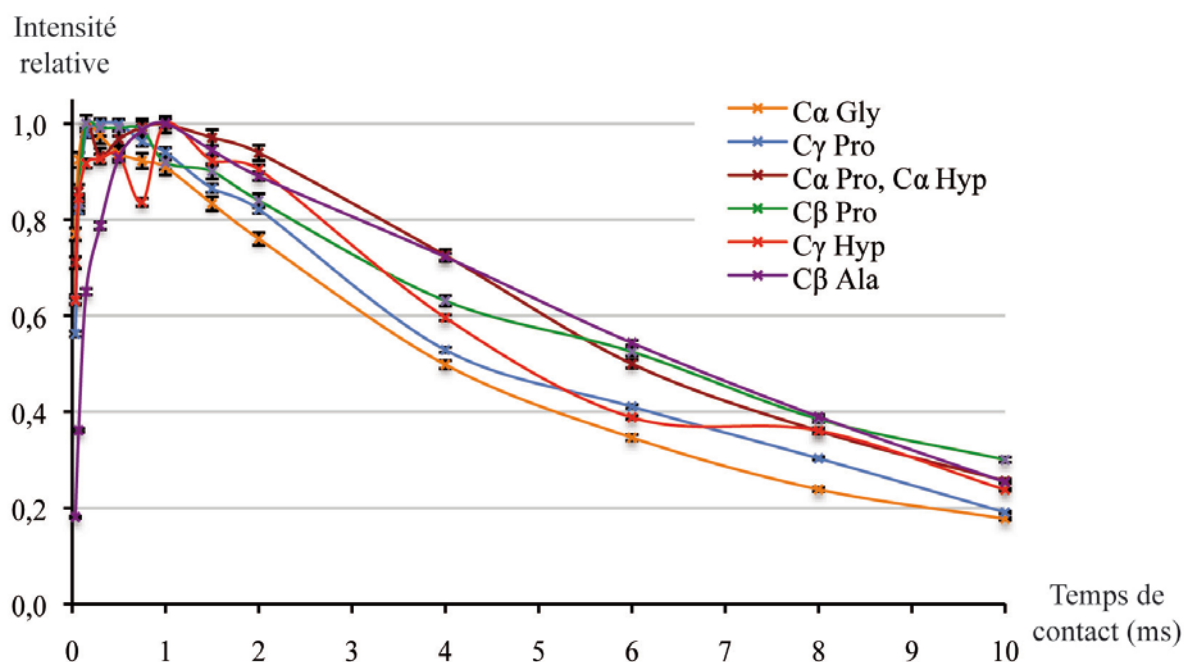


Figure 70 – Variation de l'intensité spectrale des différents pics des chaînes aliphatiques utilisés pour l'optimisation du temps de contact sur l'échantillon EC12-2693, en fonction du temps de contact, en valeur relative

Informations : pics définis dans la Figure 67 et attribués dans le Tableau 30 ; intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$; les points sont reliés entre eux afin d'aider à la visualisation de la variation ; Les intensités relatives de chaque pics sont déterminées à partir de l'intensité maximale atteinte lorsque le transfert de polarisation est optimal, l'intensité maximale prend alors la valeur 1 et les autres intensités sont déterminées relativement à elle.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; τ_c variant de 35 μ s à 10 ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

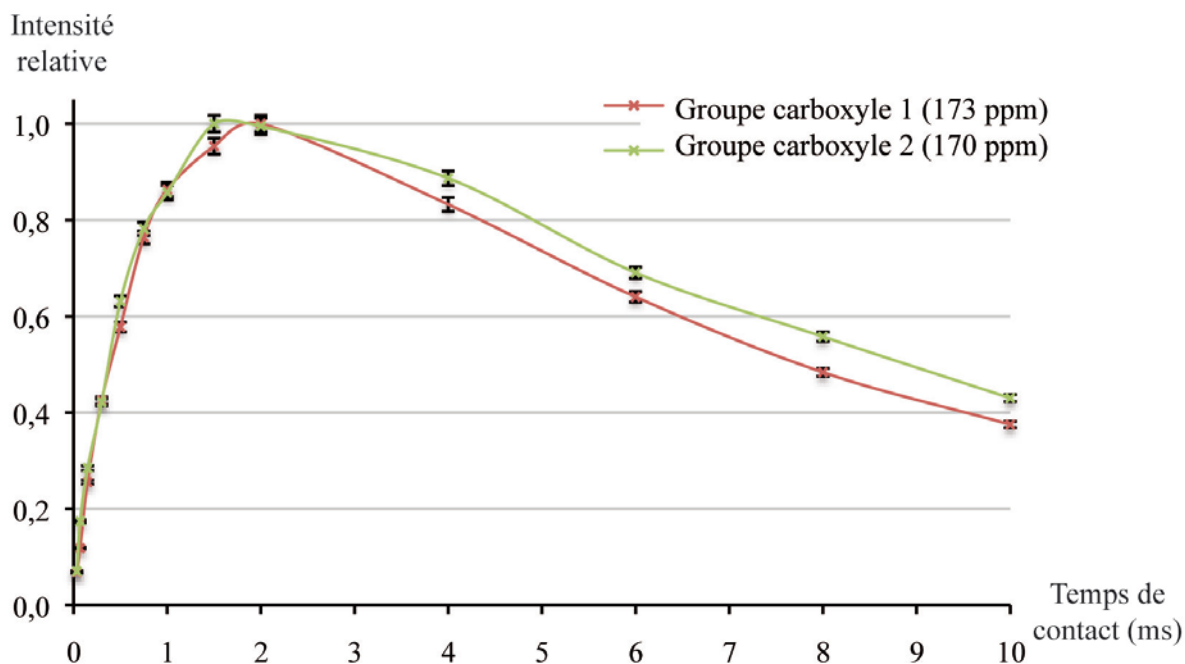


Figure 71 – Variation de l'intensité spectrale des différents pics des groupes carboxyle utilisés pour l'optimisation du temps de contact sur l'échantillon EC12-2693, en fonction du temps de contact, en valeur relative

Informations : pics définis dans la Figure 67 et attribués dans le Tableau 30 ; intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$; les points sont reliés entre eux afin d'aider à la visualisation de la variation ; Les intensités relatives de chaque pics sont déterminées à partir de l'intensité maximale atteinte lorsque le transfert de polarisation est optimal, l'intensité maximale prend alors la valeur 1 et les autres intensités sont déterminées relativement à elle.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; τ_c variant de 35 μ s à 10 ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Il apparaît de façon plus lisible pour les groupes carboxyle que les deux pics sélectionnés présentent le même comportement face à l'augmentation du temps de contact. Les choses semblent moins évidentes pour les différents pics des chaînes aliphatiques car les courbes se superposent de façon moins nette. Ceci peut s'expliquer par la présence d'un nombre plus ou moins important d'atomes d'hydrogène liés à ces atomes de carbone. En effet, nous pouvons avoir des atomes de carbone ne portant qu'un seul atome d'hydrogène (groupe méthine CH du α Pro, du α Hyp et du γ Hyp), deux atomes d'hydrogène (groupe méthylène CH_2 du γ Pro et du β Pro) ou trois atomes d'hydrogène (groupe méthyle CH_3 du α Gly et du β Ala) (cf. Annexe 1). Plus l'atome de carbone porte d'atomes d'hydrogène et plus le transfert de polarisation est efficace, ce qui se traduit par une intensité spectrale maximale atteinte avec un temps de contact plus petit. On peut néanmoins remarquer que le maximum est atteint pour des valeurs de τ_c variant de 0,3 ms à 1 ms et que les courbes sont très proches les unes des autres.

Encore une fois, afin de faciliter la lecture de ces données et l'interprétation des résultats nous avons décidé de moyenner les intensités des pics relatifs aux atomes de carbone contenus dans les chaînes aliphatiques et ceux relatifs aux groupements carboxyle. Les résultats sont présentés dans la Figure 72.

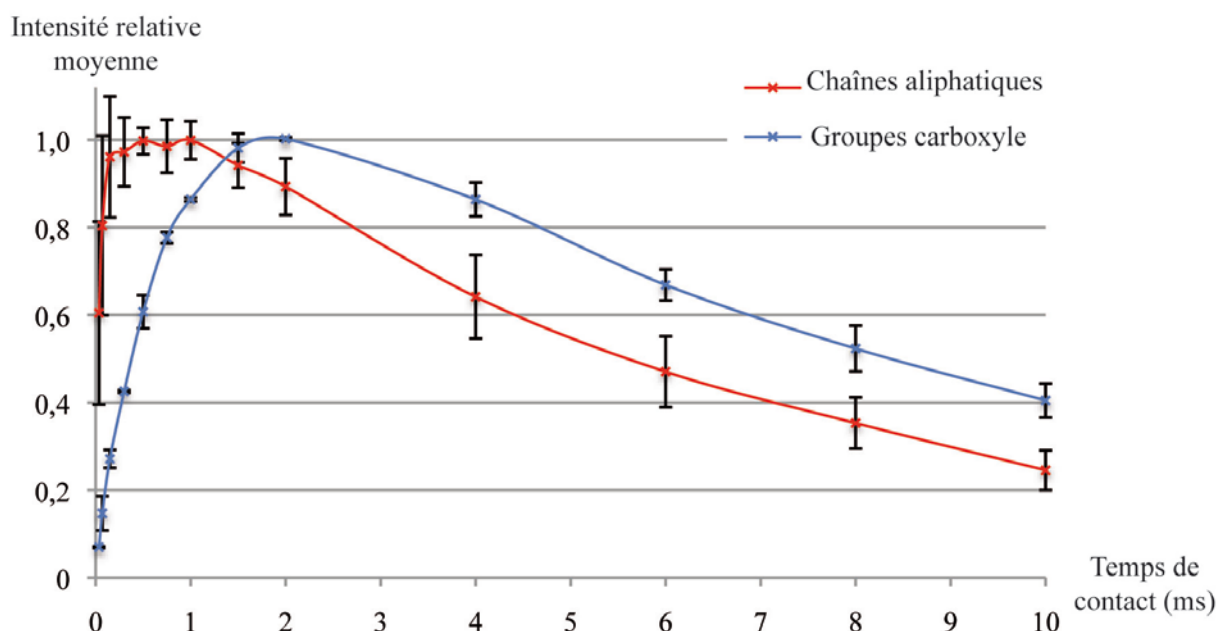


Figure 72 – Variation de la moyenne des intensités spectrales des différents pics des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle utilisés pour l'optimisation du temps de contact sur l'échantillon EC12-2693, en fonction du temps de contact, en valeur relative moyenne

Informations : pics définis dans la Figure 67 et attribués dans le Tableau 30 ; barre d'erreur à \pm un écart-type de la moyenne de l'intensité ; les points sont reliés entre eux afin d'aider à la visualisation de la variation ; Les intensités relatives de chaque pics sont déterminées à partir de l'intensité maximale atteinte lorsque le transfert de polarisation est optimal, l'intensité maximale prend alors la valeur 1 et les autres intensités sont déterminées relativement à elle.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; τ_c variant de 35 μ s à 10 ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Si nous considérons la moyenne des intensités des chaînes aliphatiques des acides aminés, nous pouvons déterminer pour cet échantillon que le temps de contact permettant un transfert de polarisation optimal est compris entre 0,3 et 1 ms. Pour les groupes carboxyle, le temps de contact optimal est compris entre 1,5 et 2 ms.

5.2.3.1.2. Utilisation des variations d'aire des pics

Nous avons réalisé les mêmes comparaisons avec les aires des groupements fonctionnels en séparant les chaînes aliphatiques et les groupes carboxyle. Les résultats sont présentés avec l'aire

absolue avant normalisation (Figure 73) et avec l'aire relative (Figure 74), après normalisation à 1 pour l'aire la plus intense dans la zone spectrale considérée.

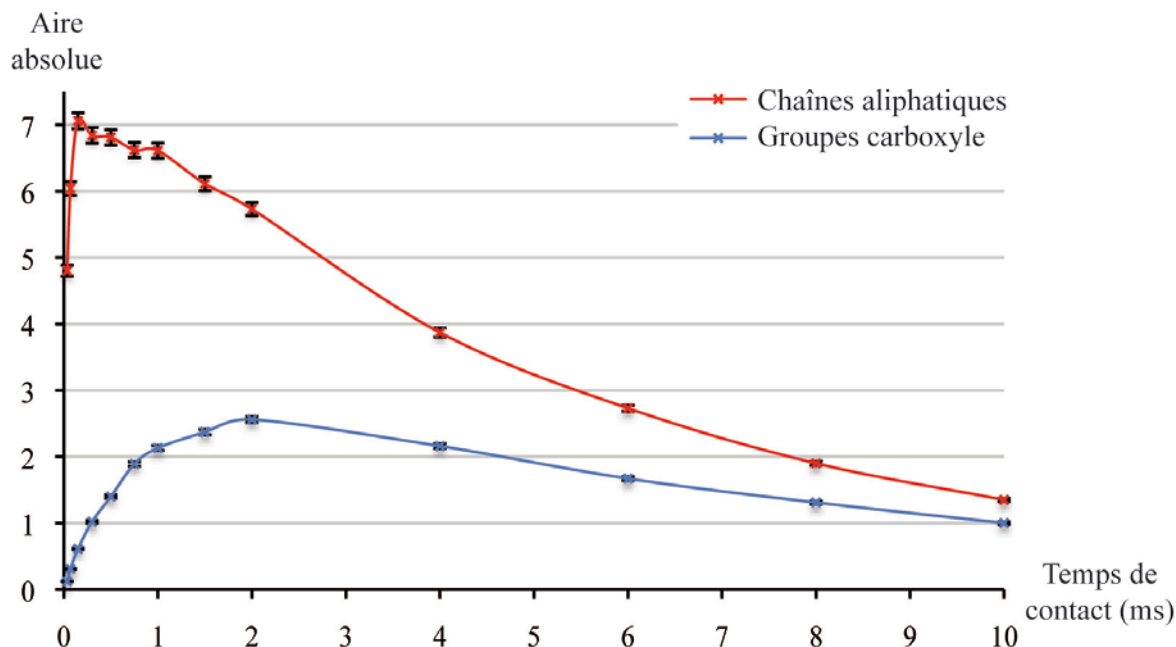


Figure 73 – Variation de l'aire des massifs des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle de l'échantillon EC12-2693, en fonction du temps de contact, en valeur absolue

Informations : massifs définis dans la Figure 67 et attribués dans le Tableau 30 ; intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$; les points sont reliés entre eux afin d'aider à la visualisation de la variation.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; τ_c variant de 35 μ s à 10 ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

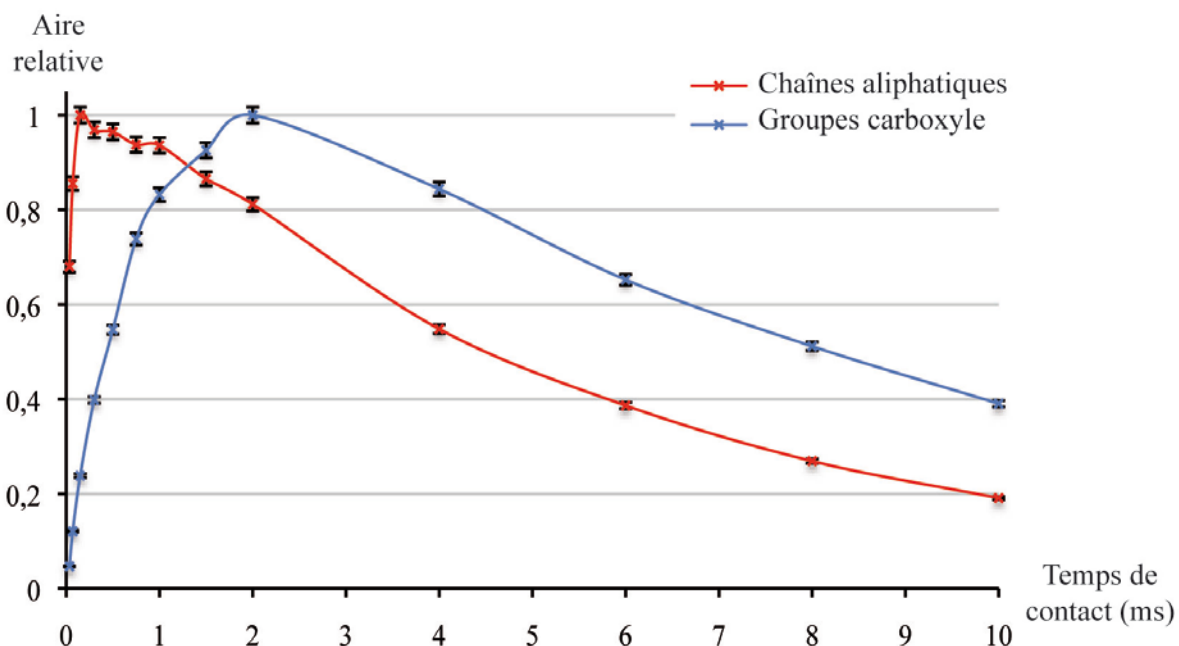


Figure 74 – Variation de l'aire des massifs des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle de l'échantillon EC12-2693, en fonction du temps de contact, en valeur relative

Informations : massifs définis dans la Figure 67 et attribués dans le Tableau 30 ; intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$; les points sont reliés entre eux afin d'aider à la visualisation de la variation ; Les aires relatives de chaque massifs sont déterminées à partir de l'aire maximale atteinte lorsque le transfert de polarisation est optimal, l'aire maximale prend alors la valeur 1 et les autres aires sont déterminées relativement à elle.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; τ_c variant de 35 μ s à 10 ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Nous constatons que l'aire la plus importante attestant d'un temps de contact optimal est différente suivant le groupement chimique considéré. Pour les chaînes aliphatiques, le temps de contact optimal est entre 0,3 et 1 ms alors qu'il est de l'ordre de 2 ms pour les groupes carboxyle.

5.2.3.1.3. Comparaison des résultats d'optimisation obtenus avec l'aire et l'intensité spectrale

La comparaison des résultats issus de la quantification de l'intensité spectrale ou de l'aire donne des résultats comparables. Les maximums pour les chaînes aliphatiques et les groupes carboxyle COOH sont atteints avec des temps de contact différents. Ces temps de contact sont légèrement différents pour les chaînes aliphatiques selon que l'on considère les aires ou les intensités spectrales. En revanche, il est identique pour les groupes carboxyle que ce soit en utilisant l'aire ou l'intensité spectrale. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'utilisation de l'intensité spectrale ne considère que certains acides aminés sélectionnés alors que l'utilisation de l'aire comprend la totalité du signal, acides aminés minoritaires inclus. L'utilisation de l'aire est plus exhaustive, complète mais est moins spécifique que l'emploi des variations d'intensité.

5.2.3.2. Comparaison entre tous les échantillons et synthèse de l'optimisation du temps de contact

Afin de comparer tous les échantillons analysés pour l'optimisation du temps de contact τ_c , nous avons appliqué à chaque spectre un facteur correctif défini précédemment. Ce facteur permet d'obtenir un spectre selon une masse théorique d'os analysée de 100 mg quel que soit l'échantillon (Tableau 32). Puis, nous avons effectué la même démarche analytique que celle détaillée pour le sujet EC12-2693.

Tableau 32 – Masse analysée et facteur correctif de chaque échantillon utilisé pour l'optimisation du temps de contact τ_c

Identifiant	Masse analysée (mg)	Teneur en os ^a	Teneur en eau ^b	Masse sèche (mg) ^c	Facteur correctif ^d
EC12-2693	118	0,894	0,106	105,5	0,95
EC12-2693 lyoph	123,1	1	0	123,1	0,81
EC12-2502	117	0,921	0,079	107,8	0,93
EC12-2652	123,7	0,936	0,064	115,8	0,86
EC12-2673	120,6	0,928	0,072	111,9	0,89
IRCGN-01	114,8	0,903	0,097	103,7	0,96
IRCGN-01 lyoph	114,5	1	0	114,5	0,87
IRCGN-02	124,5	0,923	0,077	114,9	0,87
Simon AIG-10	125,8	0,913	0,087	114,9	0,87
Simon AIG-10 lyoph	114,5	1	0	114,5	0,87
SB3	117,8	0,941	0,059	110,8	0,90
SSPM3	115,6	0,939	0,061	108,5	0,92
VAL12-11-22	125,2	0,885	0,115	110,8	0,90
SAairair12	129,7	0,915	0,085	118,7	0,84
SAairsol12	141,8	0,876	0,124	124,2	0,81
SAterre12	124	0,932	0,068	115,6	0,87

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Nous avons ensuite moyenné le signal en termes d'aire ou d'intensité pour les 6 pics des chaînes aliphatiques et les 2 pics des groupes carboxyle. Les résultats concernant les intensités relatives moyennes des chaînes aliphatiques pour nos 16 échantillons sont présentés dans la Figure 75, ceux concernant les intensités relatives moyennes des groupes carboxyle le sont dans la Figure 76.

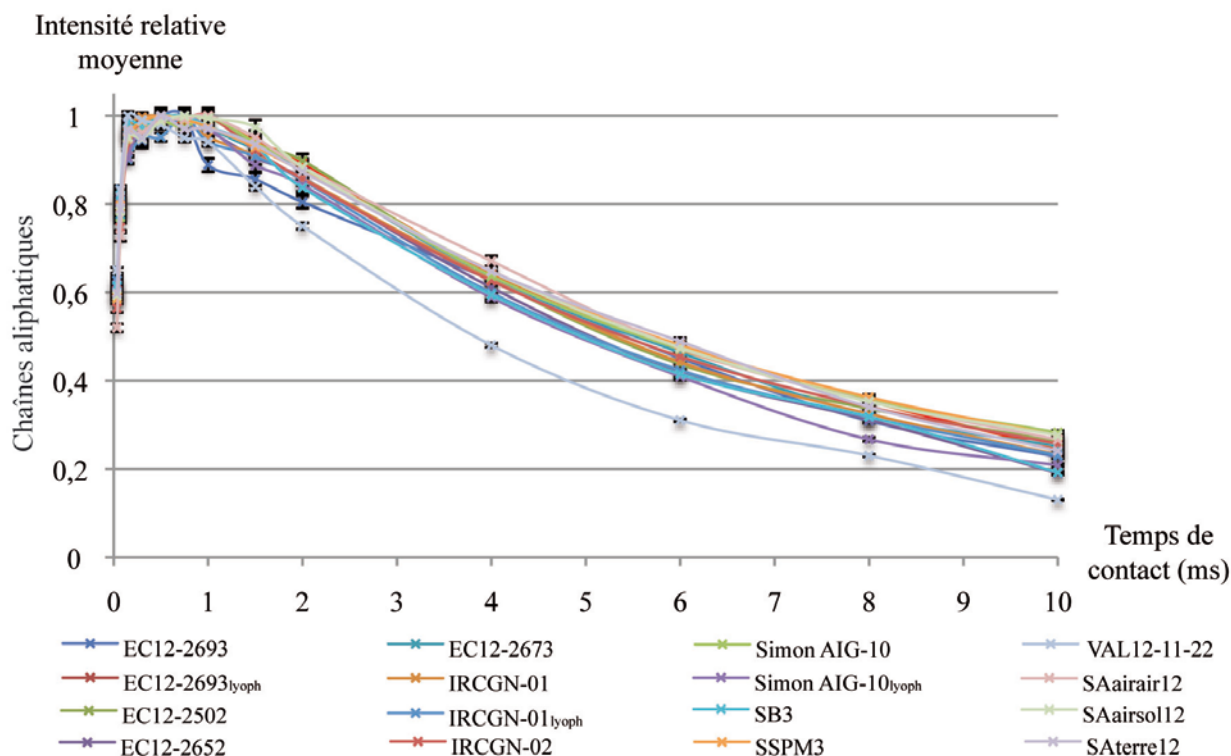


Figure 75 – Variation de la moyenne des intensités des chaînes aliphatiques des 13 individus (16 échantillons) utilisés pour l'optimisation du temps de contact, en fonction du temps de contact, en valeur relative moyenne

Informations : pics définis dans la Figure 67 et attribués dans le Tableau 30 ; intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$; les points sont reliés entre eux afin d'aider à la visualisation de la variation ; Les intensités relatives de chaque pic sont déterminées à partir de l'intensité maximale atteinte lorsque le transfert de polarisation est optimal, l'intensité maximale prend alors la valeur 1 et les autres intensités sont déterminées relativement à elle.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; τ_c variant de 35 μ s à 10 ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

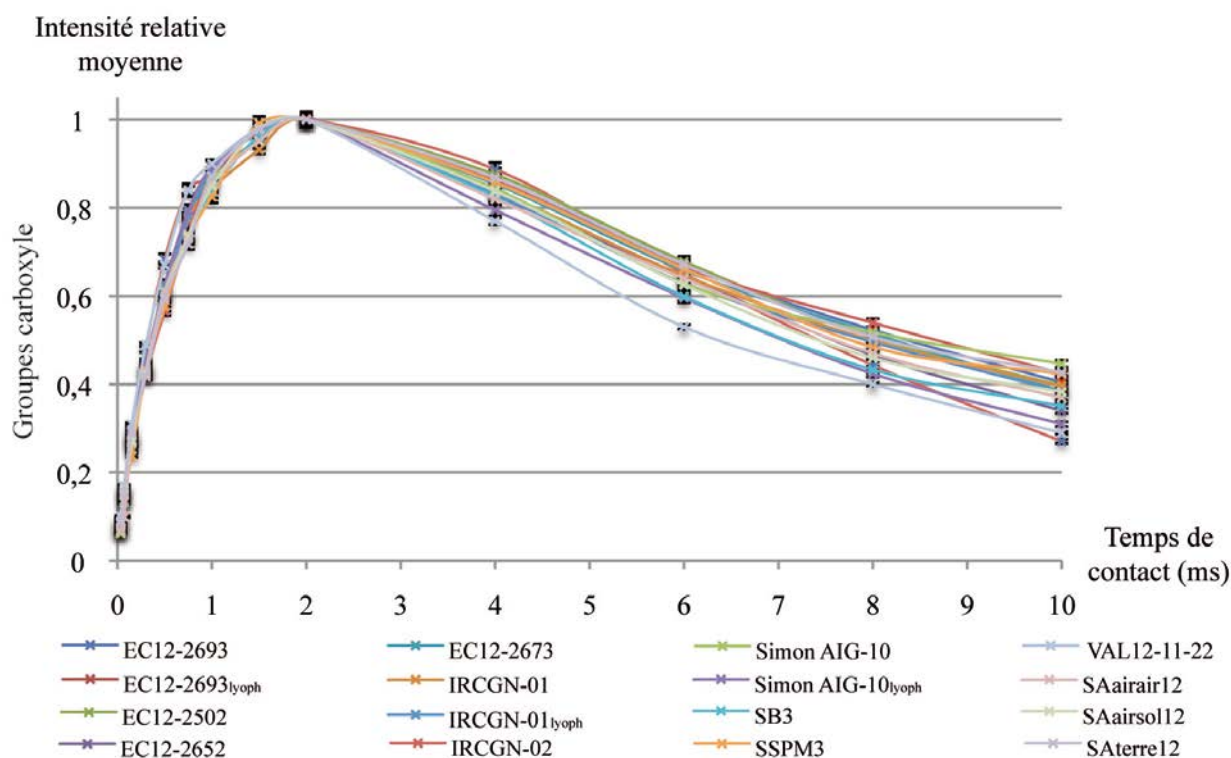


Figure 76 – Variation de la moyenne des intensités des groupes carboxyle des 13 individus (16 échantillons) utilisés pour l'optimisation du temps de contact, en fonction du temps de contact, en valeur relative moyenne

Informations : pics définis dans la Figure 67 et attribués dans le Tableau 30 ; intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$; les points sont reliés entre eux afin d'aider à la visualisation de la variation ; Les intensités relatives de chaque pic sont déterminées à partir de l'intensité maximale atteinte lorsque le transfert de polarisation est optimal, l'intensité maximale prend alors la valeur 1 et les autres intensités sont déterminées relativement à elle.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; τ_c variant de 35 μ s à 10 ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Nous pouvons constater que les intensités relatives moyennes sont sensiblement similaires pour des temps de contact courts (inférieur à 1 ms) puis il y a une légère variabilité qui apparaît par la suite. Nous constatons le même phénomène avec les groupes carboxyle pour des temps de contact inférieurs à 2 ms. Nos 16 échantillons présentent tout de même un comportement similaire que ce soit pour les chaînes aliphatiques ou les groupes carboxyle. Nous avons réalisé la même comparaison pour les aires relatives moyennes de ces deux groupements chimiques (Figure 77 et Figure 78).

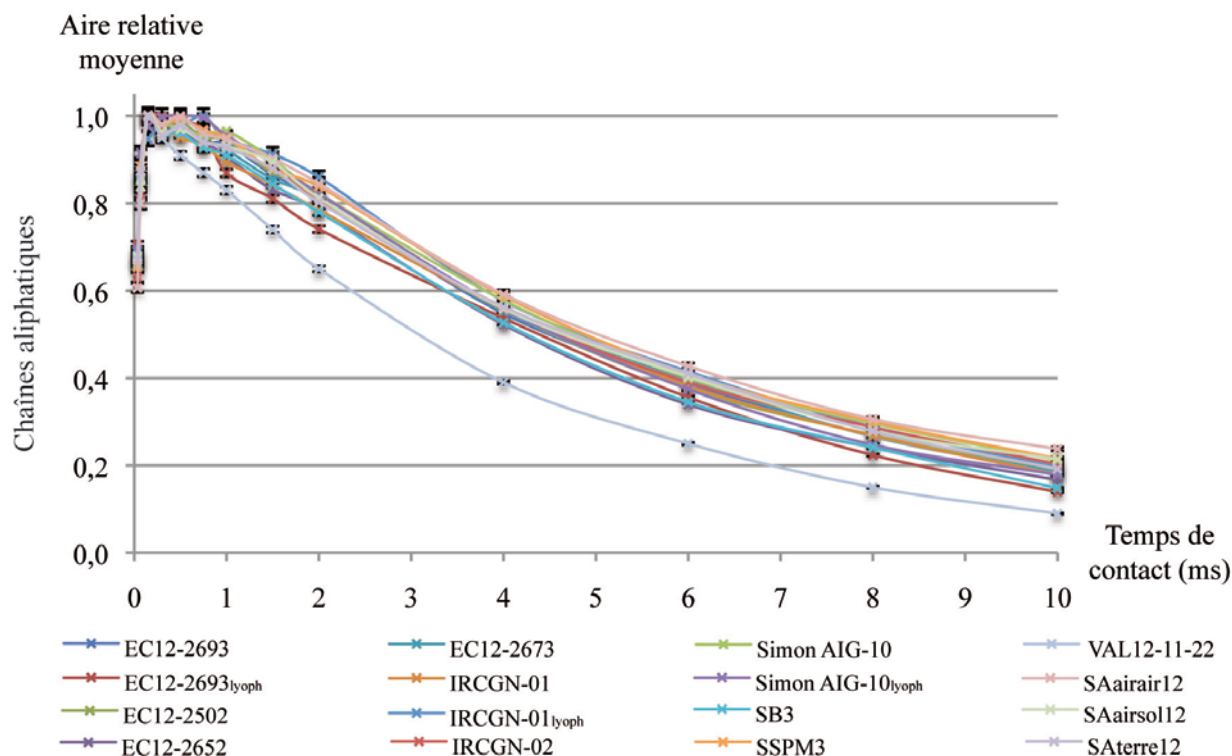


Figure 77 – Variation de l'aire du massif correspondant aux chaînes aliphatiques des 13 individus (16 échantillons) utilisés pour l'optimisation du temps de contact, en fonction du temps de contact, en valeur relative moyenne

Informations : massif défini dans la Figure 67 et attribués dans le Tableau 30 ; intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$; les points sont reliés entre eux afin d'aider à la visualisation de la variation ; Les aires relatives de chaque échantillon sont déterminées à partir de l'aire maximale atteinte pour chaque échantillon lorsque le transfert de polarisation est optimal, l'aire maximale prend alors la valeur 1 et les autres aires obtenues avec des temps de contact différents sont déterminées relativement à elle.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; τ_c variant de 35 μ s à 10 ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

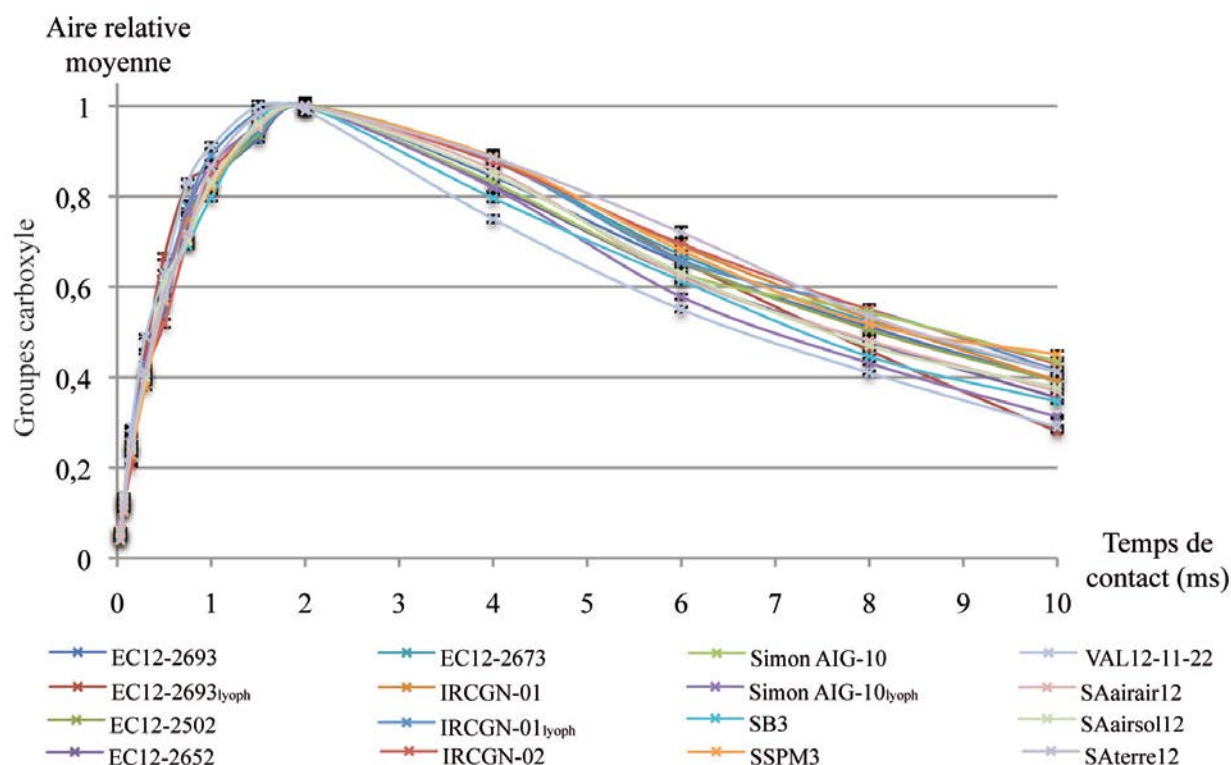


Figure 78 – Variation de l'aire du massif correspondant aux groupes carboxyle des 13 individus (16 échantillons) utilisés pour l'optimisation du temps de contact, en fonction du temps de contact, en valeur relative moyenne

Informations : massif défini dans la Figure 67 et attribués dans le Tableau 30 ; intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$; les points sont reliés entre eux afin d'aider à la visualisation de la variation ; Les aires relatives de chaque échantillon sont déterminées à partir de l'aire maximale atteinte pour chaque échantillon lorsque le transfert de polarisation est optimal, l'aire maximale prend alors la valeur 1 et les autres aires obtenues avec des temps de contact différents sont déterminées relativement à elle.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; τ_c variant de 35 μ s à 10 ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Les aires spectrales de nos 16 échantillons nous apportent les mêmes informations que les intensités spectrales avec un temps de contact optimal différent entre ces deux groupes fonctionnels.

5.2.3.3. Synthèse de l'optimisation du temps de contact

Les résultats sont similaires quels que soient le délai *post mortem*, la nature de l'os, les conditions de conservation et la lyophilisation. Afin de déterminer le temps de contact qui nous servira pour nos analyses, nous avons dans un premier temps moyenné l'ensemble des signaux normalisés de la chaîne aliphatique et des groupes carboxyle de tous les échantillons que ce soit en termes d'aire ou d'intensité spectrale. Les résultats sont présentés dans la Figure 79 et la Figure 80 respectivement.

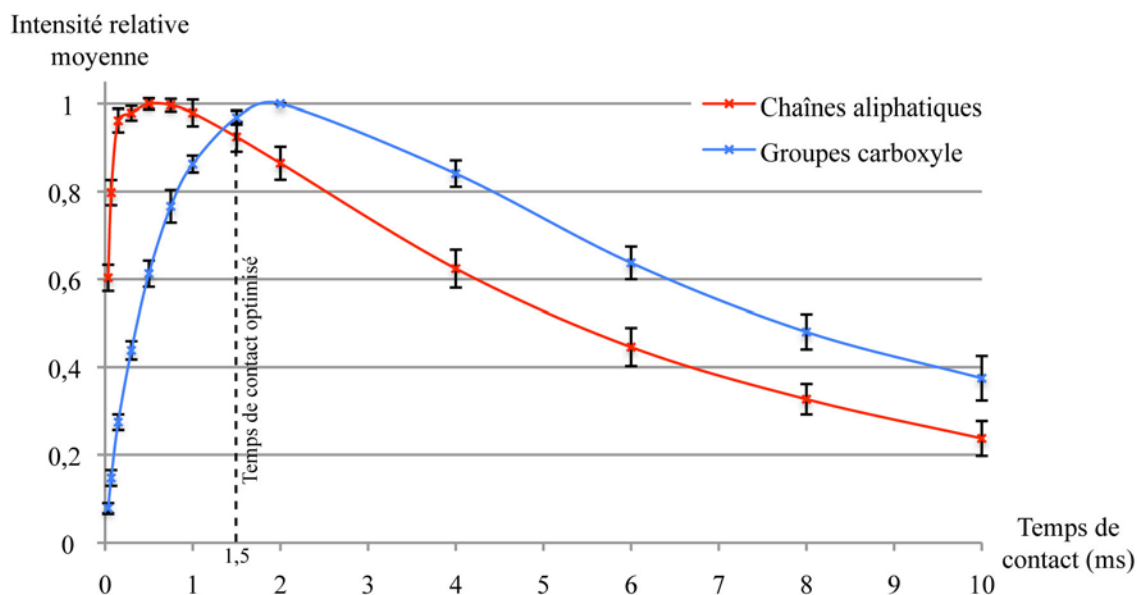


Figure 79 – Variation de la moyenne des intensités spectrales obtenue pour les chaînes aliphatiques et pour les groupes carboxyle de tous les échantillons, en fonction du temps de contact, en valeur moyenne relative

Informations : pics définis dans la Figure 67 et attribués dans le Tableau 30 ; barre d'erreur à \pm un écart-type de la moyenne de l'intensité ; les points sont reliés entre eux afin d'aider à la visualisation de la variation ; Les intensités relatives moyennes sont calculées à partir des intensités relatives propres à chaque pic et sont normalisée par rapport à la valeur maximale 1.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; τ_c variant de 35 μ s à 10 ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

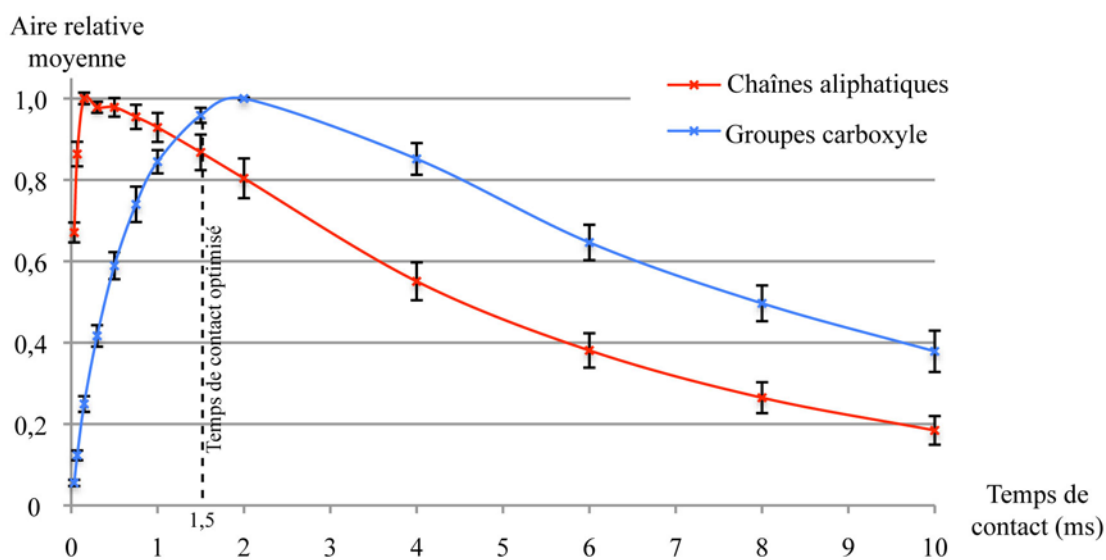


Figure 80 – Variation de la moyenne des aires des massifs des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle de tous les échantillons confondus, en fonction du temps de contact, en valeur moyenne relative

Informations : massifs définis dans la Figure 67 et attribués dans le Tableau 30 ; Barre d'erreur à \pm un écart-type de la moyenne des aires; les points sont reliés entre eux afin d'aider à la visualisation de la variation ; Les aires relatives moyennes sont calculées à partir des aires relatives propres à chaque massif et sont normalisée par rapport à la valeur maximale 1.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; τ_c variant de 35 μ s à 10 ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Pour nos analyses nous avons choisi un temps de contact de 1,5 ms. Cette valeur ne correspond ni au temps moyen entre les temps de contact optimaux des deux groupes fonctionnels pris individuellement, ni à la valeur correspondant à l'intersection des deux courbes. Cette valeur permet de se rapprocher du temps de contact optimal pour les groupes carboxyle sans s'éloigner trop de la valeur optimale des chaînes aliphatiques, choix qui s'est fondé sur le fait que la décroissance pour les chaînes aliphatiques est plus lente que la phase de croissance des groupes carboxyle, et sur le fait que nous avons délibérément choisi de favoriser un meilleur transfert de polarisation pour les groupes carboxyle car ils demandent un temps de transfert plus long (Figure 81).

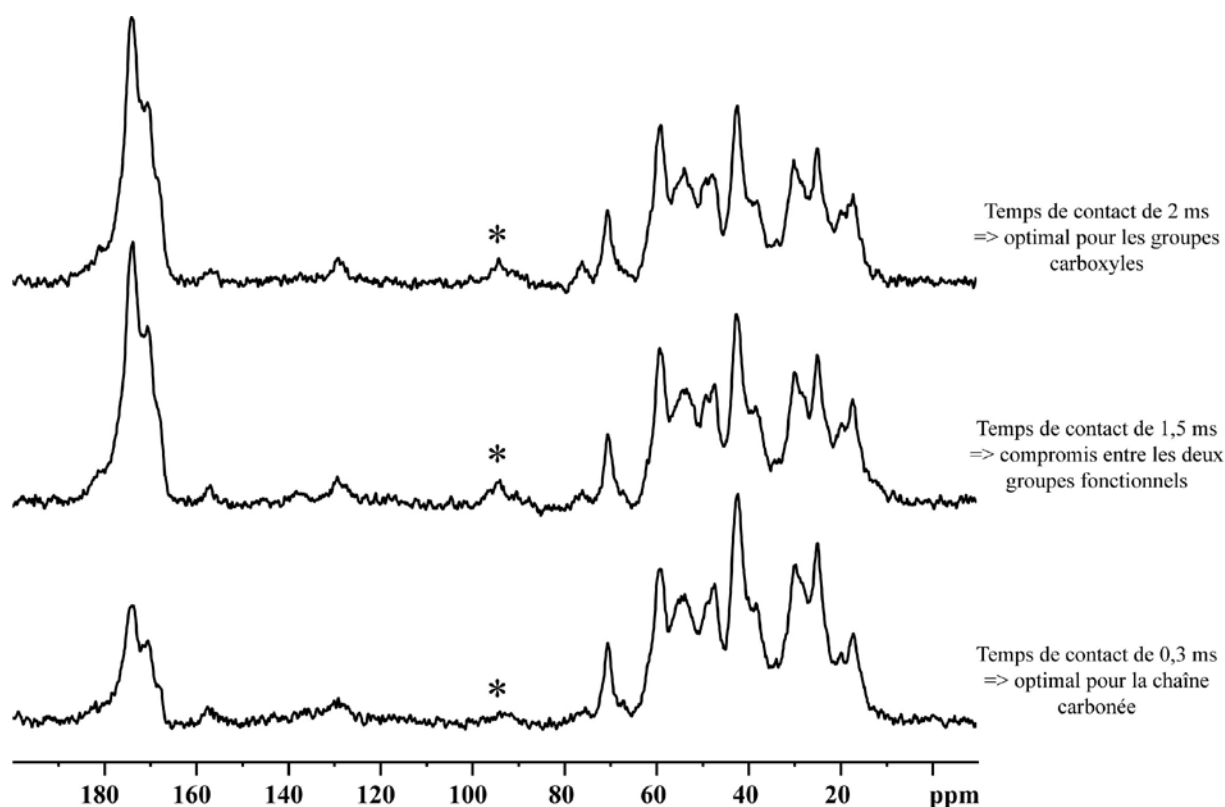


Figure 81 – Comparaison des intensités spectrales obtenues en RMN du carbone-13 sur un échantillon d'os pour des temps de contact de 0,3 ms ; 1,5 ms et 2 ms

* : bande de rotation

Informations : échantillon EC12-2693 ; masse = 118 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 2 560 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; τ_c de 0,3, 1,5 et 10 ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

L'optimisation du temps de contact qui permet de définir un temps de contact optimum commun quels que soient la nature de l'os, son milieu de conservation, son ancienneté atteste de la robustesse de notre optimisation.

6. CONFRONTATION DE NOS RESULTATS AUX DONNEES ISSUES DE LA LITTERATURE

Les spectres que nous avons obtenus sont bien résolus et nous avons pu réaliser l'attribution de la majorité des pics. La comparaison avec les données de la littérature est difficile car peu d'études traite de l'os, le plus souvent il s'agit d'études sur le tissu dentaire, sur le collagène de type I contenu au sein de l'os ou des tendons. Nous pouvons néanmoins citer Kolodziejcki (2004), qui a réalisé la comparaison entre le spectre obtenu sur de l'os cortical humain et celui obtenu avec du collagène de type I (Figure 82) uniquement au niveau des chaînes aliphatiques des acides aminés. Nous constatons que nos spectres sont comparables, les attributions identiques à la différence des résonances des lipides que ces auteurs n'ont pas considérées.

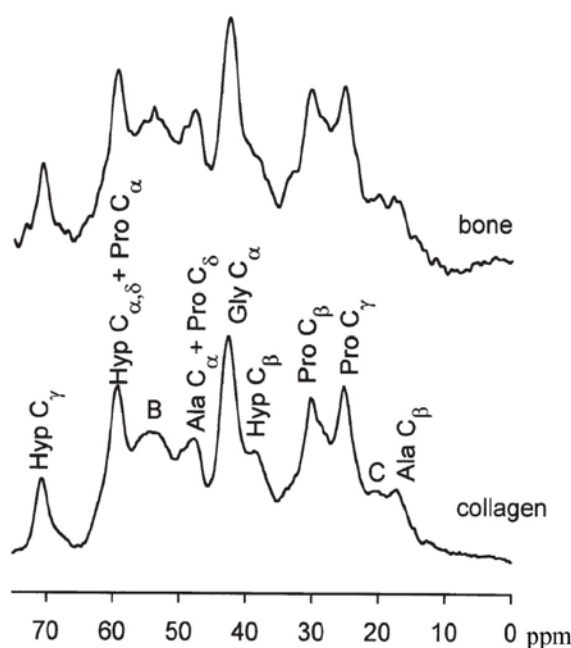


Figure 82 – Spectres RMN CPMAS du carbone-13 d'os cortical humain et de collagène de type I (d'après Kolodziejcki 2004)

Paramètres d'acquisition : champ de 9,4 T ; séquence CPMAS à 7,5 kHz ; $\tau_c = 1,6$ ms.

Nous avons effectué une série de 7 acquisitions RMN CPMAS du carbone-13 sur un échantillon de glycine afin de quantifier notre erreur expérimentale c'est-à-dire de déterminer notre taux de répétabilité de la mesure. Le coefficient de variation (ou écart-type relatif) maximal

obtenu est faible (1,7 % pour la mesure de l'aire des groupes carboxyle). Nous n'avons retrouvé que peu d'études dans la littérature qui mentionnent une telle vérification préalable à leurs analyses RMN CPMAS du carbone-13. Nous pouvons citer celle de Conte et collaborateurs (1997) qui calculent sur une série de 4 spectres d'une molécule organique complexe un écart-type relatif compris entre 0 et 6 % selon l'aire du massif pris en compte. Nos résultats apparaissent cohérents avec leur taux de répétabilité et apparaissent même meilleurs. Ceci peut s'expliquer par le fait que nous avons choisi un acide aminé simple, la glycine, qui ne présente que deux pics de résonance bien distincts. Conte et collaborateurs (1997) utilisent quant à eux un mélange d'acides humiques et fulviques qui est un composé beaucoup plus complexe chimiquement, et dont le calcul d'intégration est plus délicat.

La séquence de polarisation croisée à l'angle magique en RMN du carbone-13 (RMN CPMAS) n'est pas quantitative au sens premier du terme car le transfert de polarisation est différent selon le nombre et la proximité entre les atomes d'hydrogène et l'atome de carbone. Afin d'essayer d'avoir une séquence quantitative, il faut que le transfert de polarisation soit optimal au niveau du groupement chimique d'intérêt. Dans notre cas, le tissu osseux présente deux grandes familles de groupements chimiques, les groupes carboxyle et les chaînes aliphatiques des acides aminés : l'utilisation d'un temps de contact optimal pour ces deux n'est alors pas possible. À défaut de réaliser autant d'acquisitions que de groupements chimiques distincts par échantillon (ce qui représenterait un temps total d'acquisition pour un seul échantillon considérable), nous avons déterminé un temps de contact compromis entre les deux temps de contact optimaux des deux grandes familles de groupements chimiques. Ceci nous permet d'obtenir des résultats semi quantitatifs c'est-à-dire que nous ne pouvons pas inférer une quantité exacte de chaque groupement au sein de l'échantillon mais nous obtenons une notion de leur quantité relative des uns par rapport aux autres.

De nombreux auteurs (Conte *et al.* 1997 ; Smernik et Oades 2000 ; Hou *et al.* 2006) préconisent de réaliser, avant toute acquisition RMN CPMAS du carbone-13, une détermination du temps de contact optimal selon le protocole que nous avons utilisé. Cependant, ils ne déterminent ce temps de contact optimal qu'à partir des intensités spectrales absolues alors que nous avons déterminé notre temps de contact compromis en comparant les résultats obtenus sur les aires et intensités spectrales, absolues et relatives. Smernik et Oades (2000), ainsi que Hou et collaborateurs (2006), ont réalisé ces optimisations sur des acides aminés (respectivement la glycine et la tyrosine), et ils obtiennent des temps de contact optimaux inférieurs à 0,75 ms pour les chaînes aliphatiques de ces acides aminés et compris entre 1,5 et 2 ms pour les groupes carboxyle. Ces résultats sont similaires à ceux que nous avons trouvés dans la présente étude.

D'une manière générale, les études qui ont été menées sur le tissu osseux ou sur le collagène utilisent des temps de contact compris entre 0,7 et 2 ms (Saito et Yokoi 1992 ; Huster *et al.* 2002 ; Alfano *et al.* 2009).

Chapitre 5.2

Modifications et altérations des échantillons osseux

Au cours des analyses, nous nous sommes rendus compte que certains prélèvements présentaient un profil spectral en RMN du carbone-13 atypique, différent de celui attendu d'après la littérature (Kolodziejski 2004) et donc différent du profil spectral rencontré sur un os récent frais. Cette modification du profil spectral est assimilable à une altération de l'échantillon pour laquelle nous émettrons des hypothèses quant à sa présence.

Pour la suite de notre étude, les masses analysées et les facteurs correctifs utilisés en RMN du proton pour la totalité des échantillons sont fournies en Annexe 4 pour les acquisitions avant lyophilisation et en Annexe 5 pour les acquisitions après lyophilisation ; et en Annexe 6 pour les acquisitions en RMN du carbone-13 après lyophilisation

1. MISE EN EVIDENCE SPECTRALE DES MODIFICATIONS ET DES ALTERATIONS DU TISSU OSSEUX

Visuellement, ces altérations et modifications sont mises en évidence par la présence de pics surnuméraires plus ou moins intenses (Figure 83) en RMN du carbone-13. Ces raies se trouvent à certaines fréquences de résonance (184,5 ppm ; 168 ppm ; 33 ppm ; 28 ppm et 14,5 ppm) et ne sont pas forcément toutes présentes en même temps. Cependant nous pouvons noter que le pic le plus souvent représenté en cas de contamination est celui à 33 ppm (les intensités spectrales de tous échantillons obtenues en RMN du carbone-13 sont fournies en Annexe 7). Parfois ces pics surnuméraires sont associés à une modification de l'intensité des raies provenant de la matière organique de l'échantillon (par exemple augmentation de l'intensité des raies à 30 et 130 ppm de l'individu PRG/91).

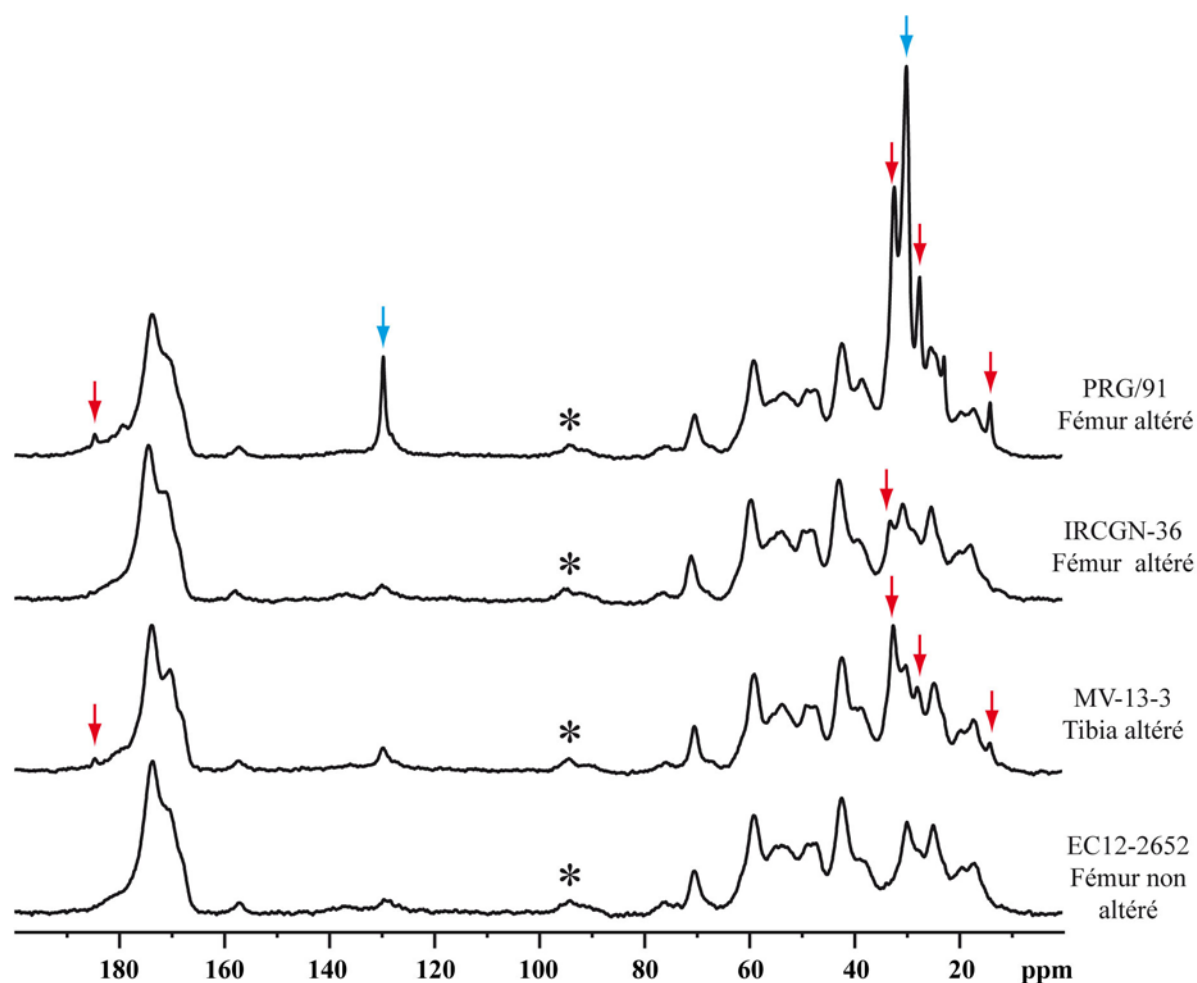


Figure 83 – Exemple de spectres RMN du carbone-13 présentant une altération

* : bande de rotation ; → : pic surnuméraire ; → : pic initialement présent ayant une intensité accrue

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; masse initiale (EC12-2652) = 122,6 mg ; masse initiale (MV-13-3) = 136,6 mg ; masse initiale (IRCGN-36) = 142,9 mg ; masse initiale (PRG/91) = 148,2 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Au sein de notre échantillon global d'étude qui représente 119 échantillons, nous avons identifiés visuellement 20 échantillons altérés présentant le pic à 33 ppm (Tableau 33).

Tableau 33 – Liste des échantillons présentant une modification de leur profil spectral

Identifiant	Os	Origine de l'os	Date de décès	Délai <i>post mortem</i> (ans)	Conservation – Traitement
MV-13-1	Fémur	Humain	XX ^e s. ap. J.-C.	≈ 100	Cercueil en pleine terre
MV-13-2	Fémur	Humain	XX ^e s. ap. J.-C.	≈ 100	Cercueil en pleine terre
MV-13-3	Tibia	Humain	XX ^e s. ap. J.-C.	≈ 100	Cercueil en pleine terre
MV-13-4	Tibia	Humain	XX ^e s. ap. J.-C.	≈ 100	Cercueil en pleine terre
MV-13-6	Humérus	Humain	XX ^e s. ap. J.-C.	≈ 100	Cercueil en pleine terre
IRCGN-19	Fémur	Humain	1941	72	Cercueil en caveau
IRCGN-36	Fémur	Humain	1934	79	Cercueil en caveau
#3 /2002	Fémur	Humain	2002	11	Eau douce, congélation ^a
#4/2002	Fémur	Humain	2002	11	Eau douce, congélation ^a
#2/2003	Fémur	Humain	2003	10	Eau douce, congélation ^a
#9/2002	Fémur	Humain	2002	11	Eau douce, congélation ^a
Simon AIG-10	Fémur	Humain	1954	59	Cercueil en pleine terre
PRG/91	Fémur	Humain	1991	12	IML, ébullition, eau de javel ^b
BRUCHAT-4	Fémur	Humain	1963	50	Cercueil en pleine terre, Dettol® ^c
BRUCHAT-13	Fémur	Humain	1942	71	Cercueil en caveau, Dettol® ^c
SAairair12	Fémur	Animal	2011	1	Air libre (face supérieure) ^d
SAairsol12	Fémur	Animal	2011	1	Air libre (face inférieure) ^e
SAterre13	Fémur	Animal	2011	2	Pleine terre
SAairair13	Fémur	Animal	2011	2	Air libre (face supérieure) ^d
SAairsol13	Fémur	Animal	2011	2	Air libre (face inférieure) ^e
Total n = 20					

^a Individu découvert immergé dans de l'eau douce avec suspicion de noyade, conservé à l'institut par congélation ;

^b Individu conservé à l'institut médico-légal de Prague (IML) dont les os ont fait l'objet d'un nettoyage par immersion dans de l'eau et de l'eau de javel en ébullition ; ^c Individu inhumé dans un cercueil dont les os ont fait l'objet d'un nettoyage avec du détergent Dettol® ; ^d Os posé en extérieur sur une terre végétale, surface supérieure sans contact avec le sol ; ^e Os posé en extérieur sur une terre végétale, surface inférieure en contact avec le sol.

Les pics supplémentaires attestant de l'altération ont des fréquences de résonance se situant essentiellement dans la zone des déplacements chimiques attribuables aux chaînes aliphatiques des acides aminés. Les aires spectrales mesurées que ce soit au niveau des groupes carboxyle ou des chaînes aliphatiques devraient alors aussi mettre en évidence cette modification spectrale (les aires spectrales de tous échantillons obtenues en RMN du carbone-13 sont fournies en Annexe 8). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé tous nos échantillons en fonction du ratio entre l'aire des chaînes aliphatiques et l'aire des groupes carboxyle que nous appellerons ratio ALICO (pour rapport entre les chaînes ALiphatiques et les groupes carboxyle CO). L'utilisation de ce ratio permet de s'affranchir de la quantité de collagène propre à chaque échantillon.

Nous avons donc calculé ce ratio pour chaque individu ne présentant pas d'altération ainsi que sa moyenne qui est de $2,63 \pm 0,06$. Les résultats sont présentés pour tous les individus, y compris les individus présentant une modification de leur profil spectral, dans la Figure 84.

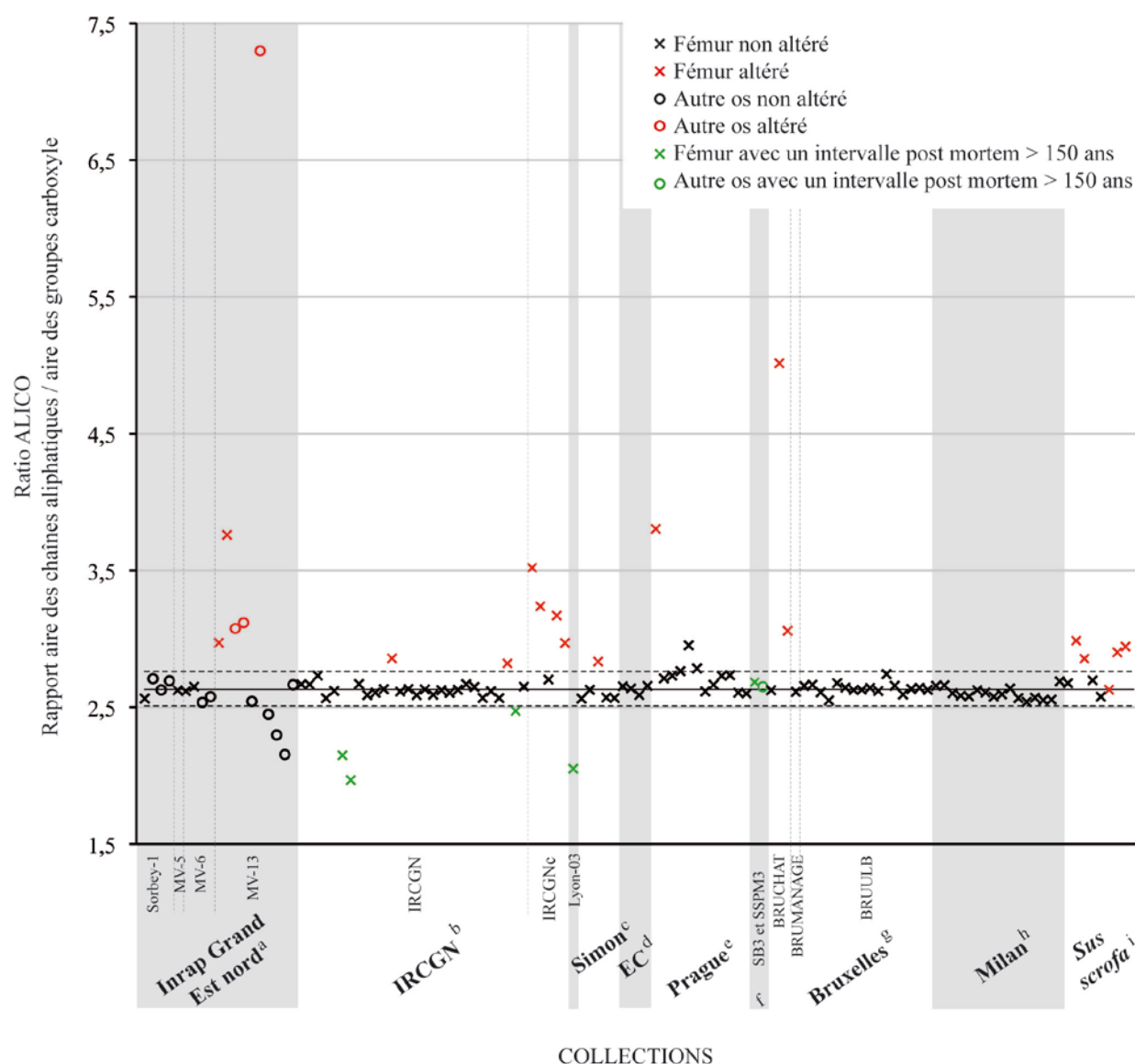


Figure 84 – Représentation graphique du rapport entre l'aire des chaînes aliphatiques et celle des groupes carboxyle ou ratio ALICO de tous les échantillons étudiés permettant de mettre en évidence les os altérés

— : ratio moyen obtenu sur les individus non altérés ; ---- : intervalle confiance à 95 % c'est-à-dire à ± 2 écarts-types.

Informations : l'intervalle de confiance de la mesure ($\pm 1,7\%$) est compris dans la taille du symbole.

^a Collection Inrap Grand Est nord comprenant 4 individus : Sorbey-1 est représenté par 4 échantillons ; MV-6 par 4 échantillons et MV-13 par 9 échantillons ; ^b Collection IRCGN comprenant 34 individus dont 5 ont été retrouvés immergés en eau douce (Identifiant IRCGNc) ; ^c Collection Simon comprenant 5 individus ; ^d Collection École de Chirurgie comprenant 4 individus ; ^e Collection de Prague comprenant 12 individus ; ^f Échantillons archéologiques ; ^g Collection de Bruxelles comprenant 20 individus : un ancien combattant de la Première Guerre mondiale (BRUMANAGE) ; 3 individus provenant d'un cimetière et 16 sujets provenant de l'Université Libre de Bruxelles ; ^h Collection de Milan comprenant 16 individus ; ⁱ Échantillons expérimentaux de *Sus scrofa*.

Nous pouvons observer que tous les os que nous avons identifiés comme altérés se situent en dehors de l'intervalle de confiance défini, excepté un (l'échantillon de faune SAtterre13) qui présente certes un pic à 33 ppm mais de faible intensité (Figure 85). Ces échantillons se

démarquent tous par le fait qu'ils se situent dans la partie supérieure du graphique indiquant que la variation du ratio est due à une augmentation de l'aire de la zone des chaînes aliphatiques au détriment de celle des groupes carboxyle.

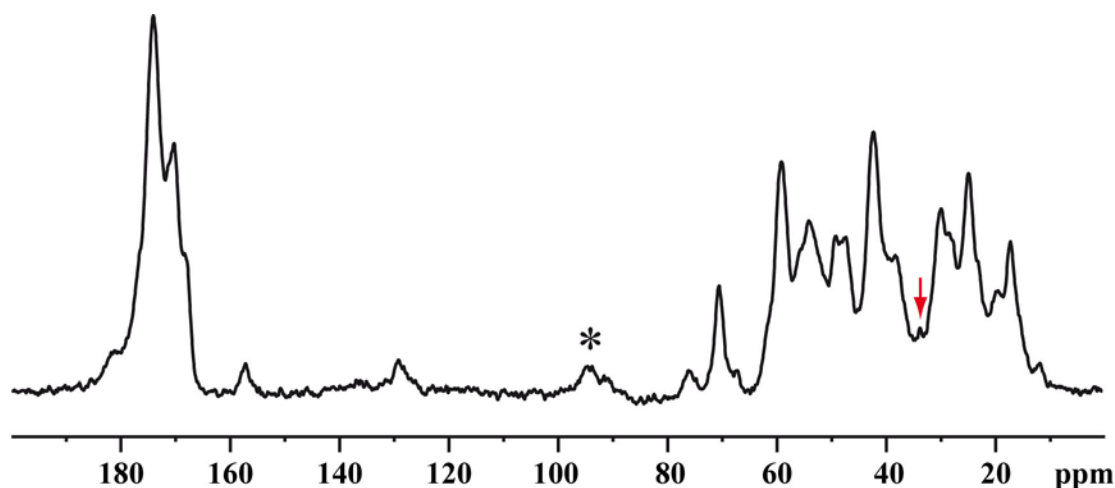


Figure 85 – Spectre RMN du carbone-13 de l'échantillon SAterre13 présentant une faible modification de son profil spectral

* : bande de rotation ; → : pic surnuméraire

Informations : masse initiale (SAterre13) = 132,9 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

A l'inverse, nous pouvons mettre en évidence qu'un des os que nous avons classé comme ne présentant pas de modification de son profil spectral apparaît en dehors de l'intervalle de confiance, dans sa partie haute (Figure 84). Il semblerait que cet échantillon issu de la collection de Prague soit tout de même altéré puisque sur le spectre (Figure 86) nous pouvons mettre en évidence un épaulement du pic résonnant entre 29,1 et 30,5 ppm, épaulement qui n'était pas suffisant pour permettre sa détection mais qui altère quand même suffisamment le spectre pour perturber le ratio ALICO précédemment défini. De plus, on retrouve cet épaulement associé à un pic supplémentaire résonnant à 14,5 ppm.

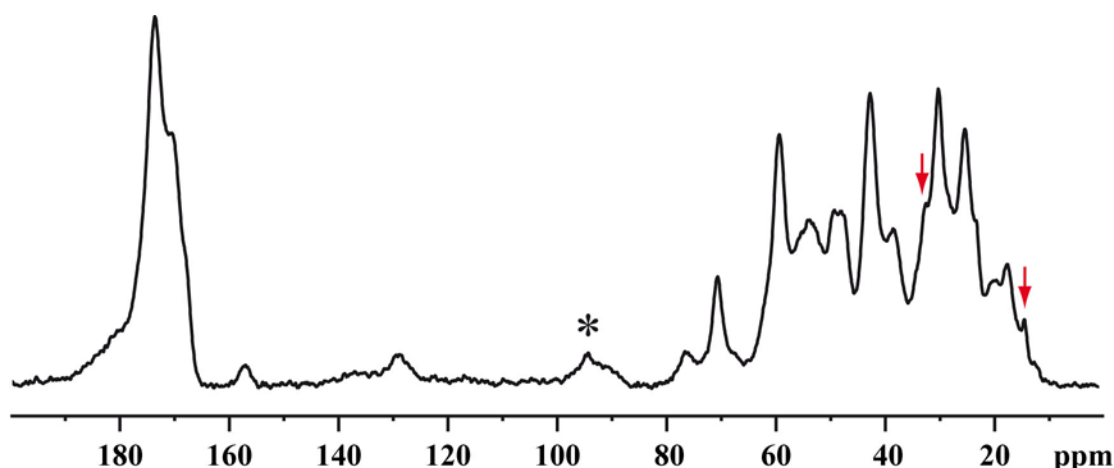


Figure 86 – Spectre RMN du carbone-13 de l'échantillon PRG596/95 présentant un épaulement sur un pic indiquant une altération

* : bande de rotation ; → : pic surnuméraire

Informations : masse initiale (PRG596/95) = 151,6 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

En revanche, nous observons aussi que certains échantillons se situent en dehors de l'intervalle de confiance, dans la partie inférieure du graphique (Figure 84). Ces échantillons ne présentent pas d'altération ou de modification du profil spectral comme nous les avons définies précédemment (présence d'un pic à 33 ppm) mais une dégradation du profil indiquant une perte d'intensité du signal des chaînes aliphatiques comparée à celle des groupes carboxyle. Il faut noter que tous ces échantillons sont soit des os différents du fémur soit des os relevant de la sphère archéologique.

Pour la suite de notre étude, nous appellerons donc un échantillon altéré, un échantillon dont le ratio ALICO est augmenté, et un échantillon dégradé, un échantillon dont le ratio ALICO est diminué.

2. DISCUSSION

2.1. METHODE D'IDENTIFICATION DES ALTERATIONS ET DEGRADATIONS DU TISSU OSSEUX

Le ratio que nous avons développé entre l'aire des chaînes aliphatiques et l'aire des groupes carboxyle nous a permis de discriminer de façon fiable les os altérés mais aussi les os présentant une dégradation de leur matière organique résiduelle.

2.2. HYPOTHESE D'IDENTIFICATION DES AGENTS POTENTIELS RESPONSABLES DE L'ALTERATION DU TISSU OSSEUX

Nous constatons que l'altération concerne aussi bien les os humains que les os de faune, intéresse tous les types d'os, tous les milieux de conservation mais ne concerne ni les os frais ni les os d'intérêt archéologique (intervalle *post mortem* compris entre 2 et 100 ans environ).

Les altérations peuvent avoir plusieurs sources, elles peuvent être d'origine anthropique ou taphonomique. En effet, l'homme peut contribuer à l'apparition de ces altérations en agissant à différents moments, du décès de l'individu jusqu'au prélèvement des échantillons d'os. Cependant, même si l'action humaine pourrait expliquer tout ou partie de ces altérations, l'environnement dans lequel sont conservés les individus peut être important (*e.g.* activité des insectes nécrophages, dépôt en eau douce, dépôt en pleine terre).

2.2.1. Altérations d'origine anthropique

Ainsi, pour les individus que nous avons analysés dans le cadre de cette étude, l'altération peut provenir du traitement réalisé sur le corps en vue de le conserver (utilisation de produits d'embaumement, congélation), du traitement des os en vue de les étudier (nettoyage à l'eau bouillante, au Dettol®, à l'eau de javel), du traitement funéraire du défunt (cercueil en pleine terre, cercueil en caveau), voire du matériau utilisé en vue de stocker les échantillons (Minigrip®).

Pour notre collection, nous avons répertorié les agents potentiels suivants comme imputables à l'action humaine survenue au moment du décès ou lors de la manipulation et du conditionnement des os :

- La **solution d'embaumement** utilisée à l'Université Libre de Bruxelles composée d'eau (H_2O), d'éthanol (C_2H_6O), de formol (CH_2O), de phénol (C_6H_6O), de glycérine ($C_3H_8O_3$), d'hydrate de chloral ($C_2H_3Cl_3O_2$), de sulfate de sodium (Na_2SO_4), de sulfate de magnésium ($MgSO_4$) et de nitrate de potassium (KNO_3) (Van Sint Jan et Rooze 1992).
- Le **Dettol®** qui se compose de chloroxyphénol (C_8H_9ClO), d'huile de pin, d'isopropanol (C_3H_8O), d'huile de ricin, de caramel et d'eau ;
- L'**hypochlorite de sodium** ($NaClO$) ;
- Le **Minigrip®** composé de polyéthylène (CH_2-CH_2)_n.

Tout d'abord, nous pouvons exclure la **solution d'embaumement** puisqu'aucun des individus qui ont été injectés ou qui ont été conservés dans cette solution ne présente d'altération telle que nous l'avons définie.

La caractérisation du **Dettol®** en RMN des liquides du carbone-13 (Figure 87) permet aussi d'exclure ce produit comme responsable de l'altération des os des individus BRUCHAT-4 et BRUCHAT-13. En effet, les pics de résonance attendus sur ce produit ne correspondent pas aux pics surnuméraires observés.

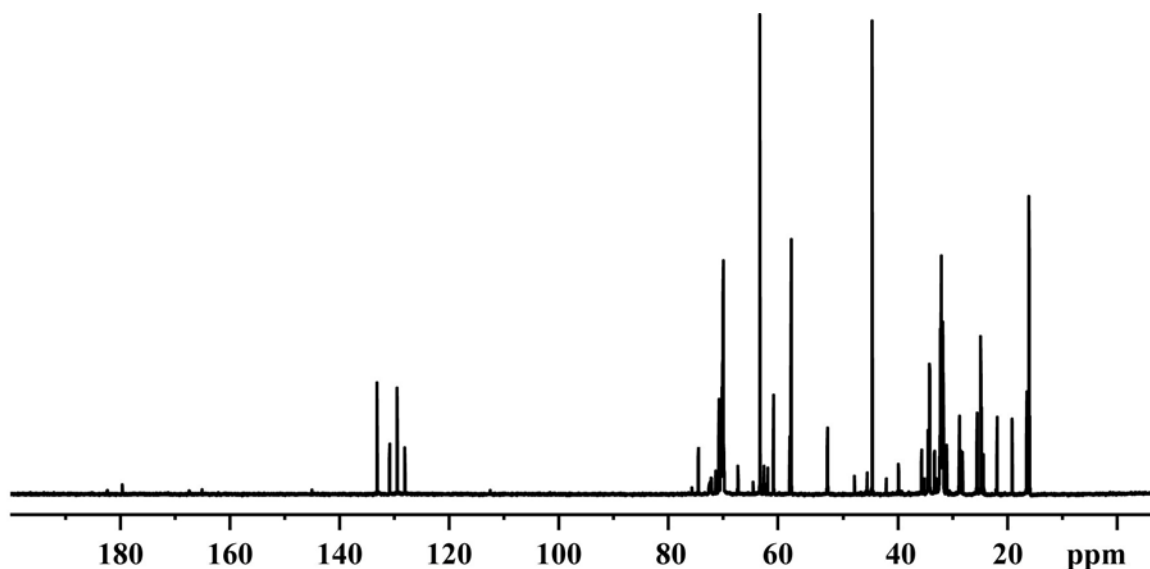


Figure 87 – Spectre RMN des liquides du carbone-13 du Dettol®

Paramètres d'acquisition : champ de 9,4 T ; fréquence de résonance du carbone de 100,56 MHz ; 18 000 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 14$ μ s ; température ambiante de 20°C ; Solvant $^2\text{H}_2\text{O}$.

De même, la composition de l'**hypochlorite de sodium**, dépourvue d'atome de carbone, ne peut pas induire l'altération observée chez PRG/91 même si son action influence la préservation de la matière organique à la surface et au sein de l'os.

Le composé qui nous pose plus de problèmes est le **Minigrip®** car le polyéthylène présente une fréquence de résonance en RMN du carbone-13 située entre 31 et 35 ppm sous la forme d'un double pic dont les intensités dépendent de sa conformation plus ou moins cristalline (Yamanobe et Kurosu 1998 ; Hu *et al.* 2000) (Figure 88). La RMN du proton (spectre non présenté) ne nous apporte pas beaucoup d'éléments supplémentaires car les groupes méthylène CH_2 du polyéthylène $(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_n$ résonnent à la même fréquence que ceux des chaînes aliphatiques des acides gras des lipides $(\text{CH}_2)_n$. Cependant, le Minigrip® peut tout de même être exclu des agents altérant puisqu'il n'expliquerait pas à lui seul la présence de tous les pics surnuméraires observés en cas d'altération avérée.

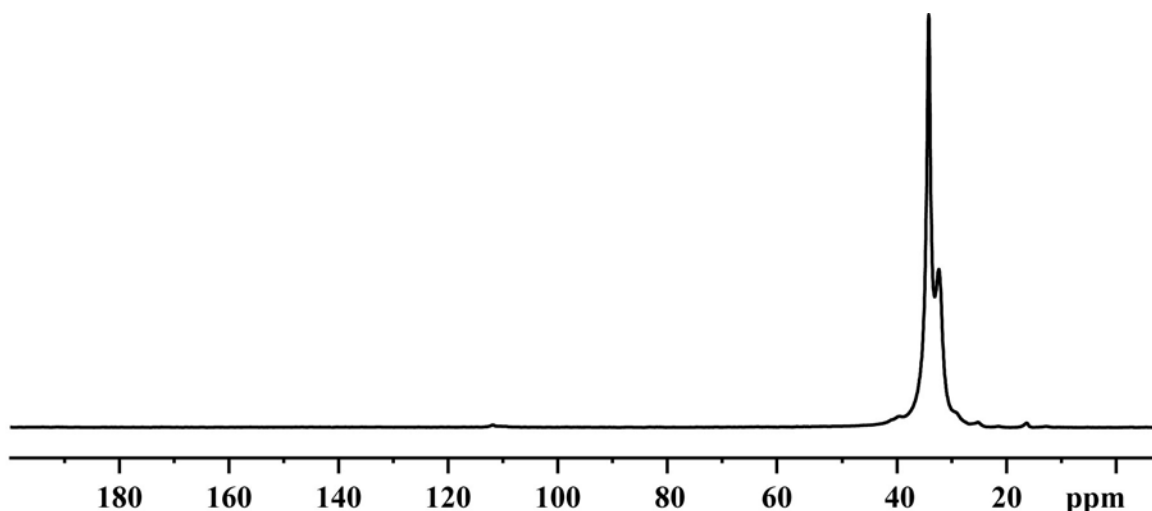


Figure 88 – Spectre RMN du carbone-13 de Minigrip®

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 5 120 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

D'une manière générale, il est difficile d'incriminer un agent responsable de l'altération comme étant d'origine anthropique puisque l'altération ne concerne que certains os issus de plusieurs collections, et que les protocoles de nettoyage et de conservation sont propres à chaque institution.

2.2.2. Altérations d'origine taphonomique

Les autres sources d'altération possible proviennent des processus taphonomiques liés au milieu de décomposition puis de conservation du cadavre, que ce soit la mise en cercueil en pleine terre ou en caveau, le dépôt à l'air libre, une immersion prolongée en eau douce suivie d'une congélation, voire l'inhumation directement en pleine terre. Nous avons identifié différents agents possibles issus de ces processus taphonomiques. Il s'agit, d'une part, des **insectes nécrophages** dont les pupes se décomposeraient au voisinage de l'os et engendreraient ainsi une contamination. D'autre part, il pourrait s'agir de l'action des **acides humiques** contenus dans le sol qui s'infiltreraient dans la trame osseuse, et donc de la nature du sol environnant. Enfin, il faut envisager la présence d'**adipocire** au sein du tissu osseux.

Les **insectes nécrophages** participent au processus de décomposition du cadavre. Au cours des cycles de développement des larves, les restes de l'action des insectes (cuticule externe des insectes morts et pupes vides) se retrouvent dans le volume, au contact ou à proximité du corps. Ces restes sont composés essentiellement de **chitine** ($C_8H_{13}NO_5$)_n, qui présente un signal RMN caractéristique (Zhang *et al.* 2000) dont les fréquences de résonance sont différentes de celles

retrouvées dans le cas de nos échantillons altérés. Nous avons comparé le spectre d'un échantillon altéré avec celui obtenu à partir de la pupa d'un diptère (*Calliphora vicina*) couramment rencontré en entomologie médico-légale (Figure 89) et présentant un profil spectral typique de la chitine. Il ne s'agit donc pas de l'agent responsable de l'altération pouvant expliquer nos résultats.

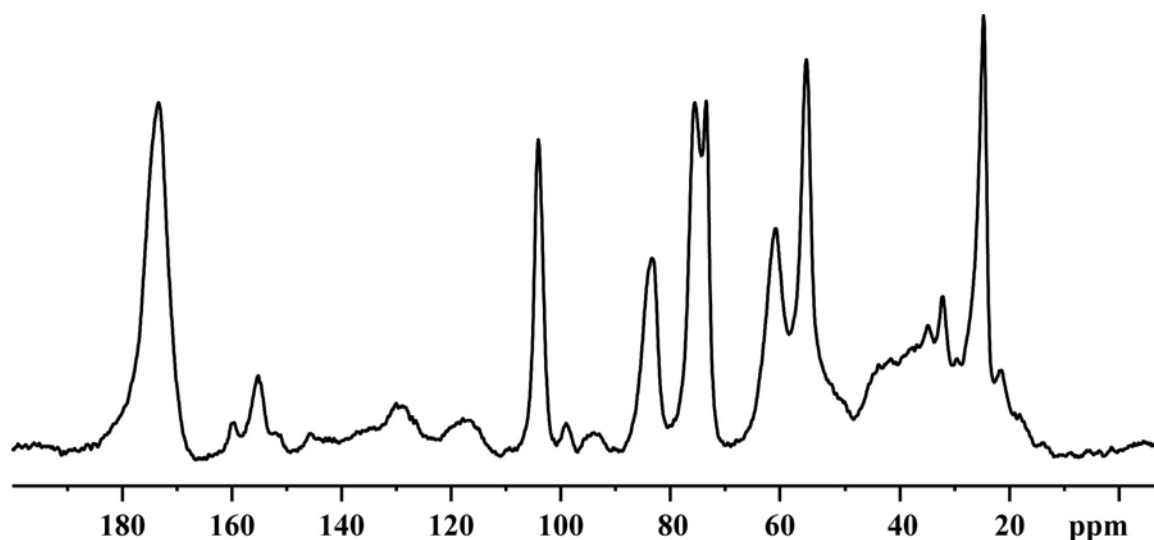


Figure 89 – Spectre RMN du carbone-13 de pupes de *Calliphora vicina*

Informations : masse = 104,2 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 5 120 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

L'**humus** est la couche supérieure du sol qui est riche en acides humiques et fulmiques. Ces acides sont la principale source de matière organique contenue dans le sol. Il n'existe pas de formule chimique unique pour ces acides car leurs compositions varient en fonction des éléments de dégradation dont ils proviennent. On peut cependant utiliser le modèle fourni par Stevenson (Stevenson 1982) représenté dans la Figure 90.

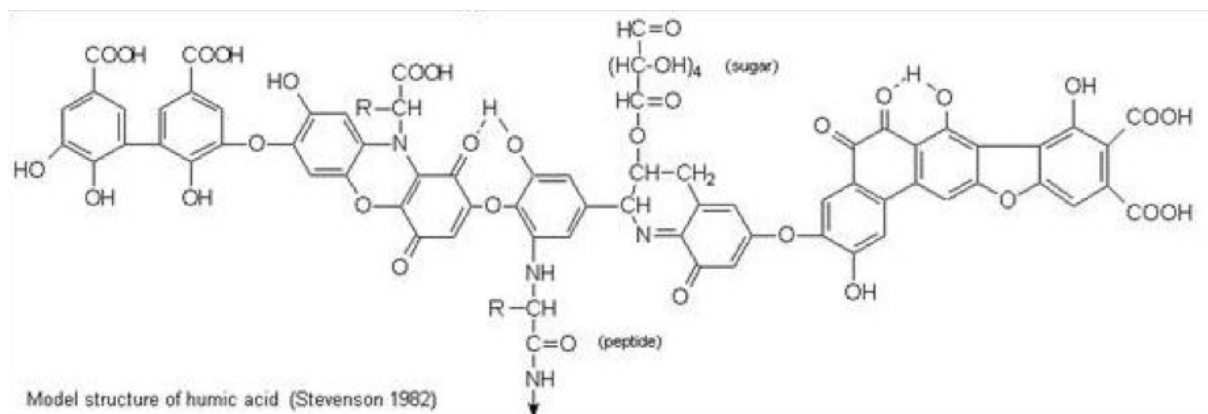


Figure 90 – Modèle de la structure de l'acide humique

(In : Roger (2010) d'après Stevenson (1982))

Comme les acides humiques et fulviques correspondent à des mélanges polymériques complexes, très variés, leurs identifications par RMN du carbone-13 sont très difficiles. En effet, les gammes de déplacements chimiques de chacun de leurs composants sont très vastes allant jusqu'à plus d'une dizaine de ppm (Cook *et al.* 1996 ; Cook et Langford 1998) ce qui interdit une attribution certaine, dans notre cas, d'un pic surnuméraire à ces acides humiques (Figure 91). Cependant, il est intéressant de noter que les groupements alkyles des acides humiques se situent préférentiellement entre 30 et 32 ppm ce qui reste cohérent avec l'altération que nous observons. Néanmoins, il faut noter que certains os présentent cette altération alors qu'ils n'ont pas été inhumés ou au contact du sol (IRCGN-#3/2002, IRCGN-#4/2002, IRCGN-#2/2003, IRCGN-#9/2002 et PRG/91).

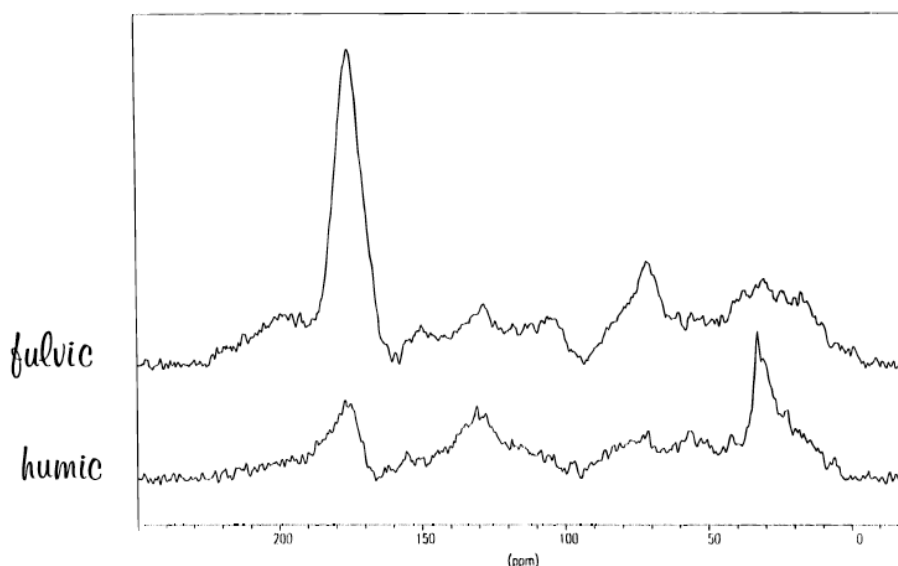


Figure 91 – Spectres RMN du carbone-13 d'acide fulvique laurentian (LFA) et d'acide humique laurentian (LHA)

(d'après Cook et Langford 1998)

Paramètres d'acquisition : fréquence de résonance du carbone de 75,469 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 8 kHz ; $D_1 = 1$ s ; τ_c (acide fulvique) = 3 ms ; τ_c (acide humique) = 2,5 ms.

Une autre hypothèse quant à la présence de cette altération est la présence d'**adipocire**, qui se forme par saponification du tissu adipeux de l'organisme. Au début du phénomène de formation de l'adipocire, ou transformation adipocireuse, les lipides présents dans l'organisme subissent une hydrolyse responsable de la fragmentation des triglycérides en glycérol et en acides gras, plus ou moins saturés. En fin de processus (où la teneur en acide gras peut atteindre 70 % de l'organisme), on est face à des acides gras saturés c'est-à-dire des acides carboxyliques à chaîne aliphatique $\text{H}_3\text{C}(-\text{CH}_2)_{n-2}-\text{COOH}$. Forbes et collaborateurs (2005a) retrouvent principalement les trois acides gras suivant dans l'adipocire : 36 % d'acide oléique ($\text{C}_{18:1}$), 32,4 % d'acide palmitique ($\text{C}_{16:0}$) et 25,8 % d'acide stéarique ($\text{C}_{18:0}$). Les fréquences de résonance attendues sont donc celles des chaînes grasses des lipides (Tableau 14 page 160), avec la présence de certains pics lors de certaines phases du processus (par exemple, celui des groupes méthine $-\text{CH}=\text{CH}-$ résonnant entre 129,7 et 130 ppm et qui attestent de l'insaturation des acides gras), qui ne se retrouvent pas dans les phases finales où les acides gras sont saturés. Ces déplacements chimiques correspondent à ceux mis en évidence dans les cas d'altération. La présence de certains pics (184,5 ppm ; 168 ppm ; 28 ppm et 14,5 ppm) dans les échantillons, associés à la présence systématique du pic à 33 ppm (attribuable aux groupes méthylène CH_2) semble attester de la validité de cette hypothèse. Ainsi, la présence différentielle de certains pics indiquerait que le processus de transformation d'adipocireuse n'est pas achevé.

L'altération que nous mettons en évidence en RMN du carbone-13 (Figure 83 page 218) n'est pas visible de façon aussi nette en RMN du proton. En effet, l'altération provenant des différents groupes chimiques des lipides possède les mêmes fréquences de résonance (Tableau 18 page 165) comme l'illustre la Figure 92. Les spectres protons ne suffisent donc pas à eux seuls à mettre en évidence l'altération.

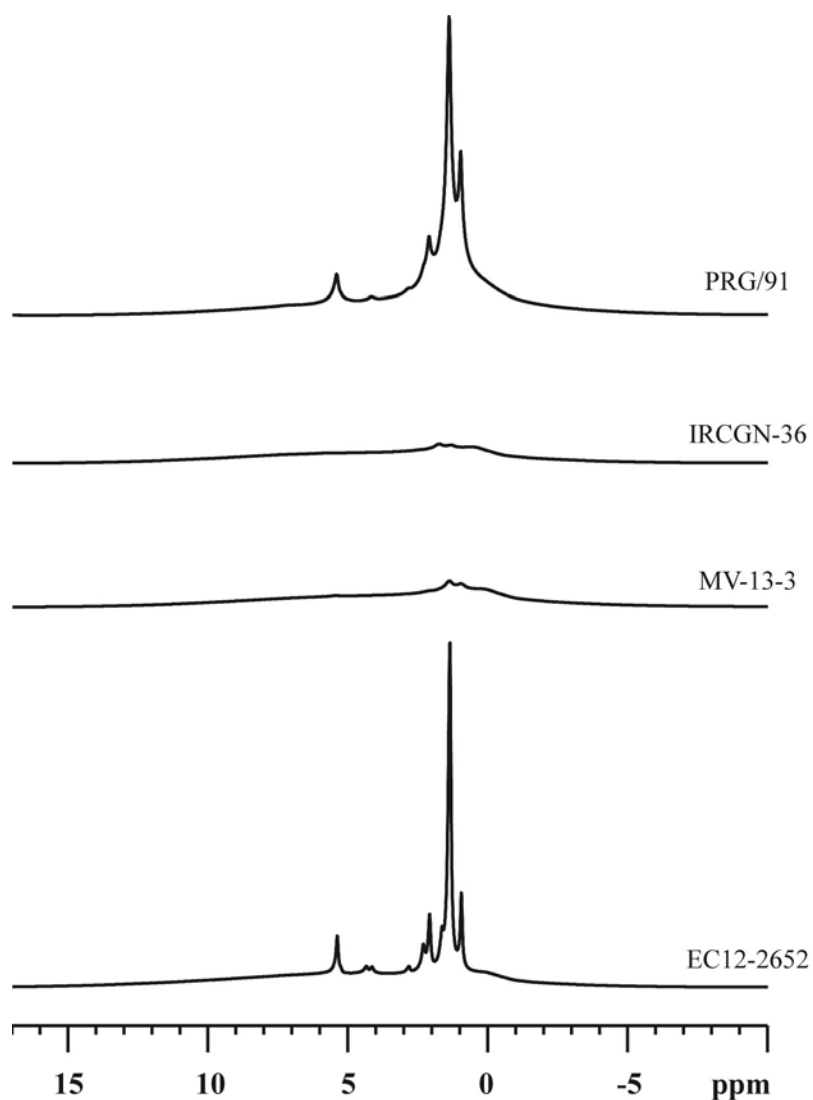


Figure 92 – Exemple de spectres RMN du proton des échantillons présentant une altération mise en évidence en RMN du carbone-13

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; masse sèche (EC12-2652) = 122,6 mg ; masse sèche (MV-13-3) = 136,6 mg ; masse sèche (IRCGN-36) = 142,9 mg ; masse sèche (PRG/91) = 148,2 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

2.3. SYNTHÈSE ET DISCUSSION SUR LES ALTERATIONS ET LES DEGRADATIONS DU TISSU OSSEUX

Au cours de l'analyse des altérations du profil spectral de certains échantillons, nous avons établi le ratio ALICO entre l'aire obtenue avec les chaînes aliphatiques et celle obtenue avec les groupes carboxyle. Ce ratio est apparu pertinent pour contrôler la qualité de préservation du collagène indépendamment de sa quantité. Les modifications de ce ratio permettent de mettre en évidence d'éventuelles altérations (augmentation du ratio) ou éventuellement une dégradation de l'échantillon (diminution du ratio).

Nous pensons que les altérations que nous avons mises en évidence correspondent à l'infiltration d'adipocire dans la trame osseuse. Cette hypothèse est soutenue par la gamme de déplacements chimiques que nous observons dans les cas d'altération mais aussi par les conditions de conservation dans lesquelles étaient conservés les individus que nous avons échantillonnés. En effet, il semblerait qu'il y ait peu de points communs entre tous les individus altérés mais si nous étudions de plus près leurs caractéristiques, nous constatons que ce sont tous des individus ayant un intervalle *post mortem* compris entre 1 et 100 ans environ. Cela corrobore notre hypothèse puisque la transformation adipocireuse se produit généralement dans les premiers mois suivant le décès (Mellen *et al.* 1993) et disparaît complètement lorsque les os sont très anciens (cf. partie 1, page 56) (Jarvis 1997). Pour les individus que nous avons identifiés comme altérés et inhumés dans des cercueils, il a été montré que les cercueils ralentissent la formation de l'adipocire alors que les vêtements la favorisent (Forbes *et al.* 2005c). De plus, le cercueil limite l'accès au cadavre pour les insectes nécrophages et donc inhibe la décomposition. Dix de nos échantillons altérés correspondent à ces critères.

Il faut cependant noter que pour l'individu MV-13 (représenté par 9 échantillons provenant de différents os), l'altération concerne les os des membres inférieurs (fémurs et tibias) ainsi que l'humérus gauche. Son humérus droit, une vertèbre cervicale et deux de ses vertèbres lombaires sont exempts d'altération. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées. D'une part, la présence d'adipocire sur seulement certains os due à des conditions locales au sein même du cadavre différentes (*e.g* masse de tissu adipeux, passage d'une nappe phréatique). D'autre part, une conservation différentielle de cette adipocire. Cet individu étant décédé dans le courant du XXe siècle de notre ère, une partie de l'adipocire s'est peut être déjà dégradée et a disparu.

Concernant l'individu BRUCHAT-4, il a été observé au cours des fouilles du cercueil inhumé en pleine terre, que le battage de la nappe phréatique était important. La présence d'eau a ainsi pu favoriser la transformation adipocireuse sur cet individu. Deux autres individus proviennent du même cimetière, BRUCHAT-2 et BRUCHAT-13, et étaient inhumés dans des cercueils mais au sein de caveau c'est-à-dire sans contact direct avec les eaux de la nappe phréatique. Un seul de ces deux sujets présente une altération, BRUCHAT-13. Une des explications concernant cette altération différentielle des individus au sein d'un même cimetière et différentielle entre des individus conservés dans les mêmes conditions, peut provenir de leur date de décès avec le sujet décédé le plus récemment (BRUCHAT-4) qui présente une altération quantitativement beaucoup plus importante que BRUCHAT-13 dont la date de décès est plus ancienne. Quant à BRUCHAT-2, son décès remontant à 1920, nous pouvons considérer que si adipocire il y a eu, elle s'est dissoute et a disparu. Cependant, l'absence d'adipocire sur cet individu associée à la présence d'adipocire sur d'autres individus du même site ne permet pas de dire avec certitude qu'il y a eu de l'adipocire.

Au niveau de la collection IRCGN, quatre des cinq individus identifiés IRCGNc présentent une altération. Ces individus sont tous des sujets ayant été retrouvés dans de l'eau douce (après une période d'immersion que nous ne connaissons pas) avec comme cause du décès une suspicion de noyade. Il a été montré que l'immersion était un environnement favorable à la formation d'adipocire car ce milieu est pauvre en oxygène, limite la contamination bactérienne et, de par sa teneur en eau, facilite l'hydrolyse et l'hydrogénation des acides gras (Mellen *et al.* 1993 ; Gill-King 1997 ; Pfeiffer *et al.* 1998 ; Notter *et al.* 2009). Ces individus ont été retrouvés dans un contexte propice à la formation d'adipocire et donc il apparaît cohérent qu'ils présentent cette altération.

Les os de faune présentant cette altération sont essentiellement des os qui ont été laissés à l'air libre. Ces os présentent la particularité d'être très récents (intervalle *post mortem* entre un et deux ans) et ils avaient fait l'objet d'un décharnement préalable à l'étude expérimentale. La transformation adipocireuse provient donc essentiellement de la moelle osseuse qui était contenue dans la diaphyse. On ne retrouve pas l'altération sur l'os frais ni sur l'os enterré daté de un an. En revanche, on la retrouve, en très petite quantité, sur l'os enterré daté de 2 ans. Plusieurs hypothèses peuvent être émises. D'une part, il s'agit de deux os distincts qui présentent donc une susceptibilité à la formation d'adipocire qui peut être différente d'autant plus que la formation d'adipocire n'est pas systématique pour tous les os. D'autre part, la formation d'adipocire n'avait peut-être pas eu le temps d'être initiée sur l'os présentant un intervalle *post mortem* de un an, alors que le délai de deux ans a suffi à amorcer le processus (Rodriguez et bass 1985).

Concernant l'individu PRG/91, qui présente lui aussi une altération, nous n'avons aucune information sur ses conditions de conservation antérieures à son arrivée à l'institut médico-légal et nous ne pouvons donc malheureusement émettre aucune hypothèse.

Chapitre 5.3

Variations intra-individuelles et inter-individuelles des constituants du tissu osseux

Nous avons mis en évidence qu'il existait des différences spectrales qui n'étaient pas dues à la masse de l'échantillon ni à son degré d'hygrométrie. Les variations observées ne correspondent pas non plus à une altération du tissu osseux secondaire à la transformation adipocireuse. Ces différences sont donc propres à chaque échantillon et peuvent relever de différents paramètres individuels tels l'âge au moment du décès et le sexe de l'individu, paramètres que nous développerons dans ce chapitre, ou des paramètres relatifs à l'intervalle *post mortem* et aux conditions de conservation que nous détaillerons dans le chapitre suivant.

Dans le cadre de ce chapitre, nous allons étudier l'influence des facteurs âge au décès et sexe sur le profil spectral en RMN du carbone-13 et du proton en étudiant plus particulièrement les aires et intensités spectrales répertoriées dans le Tableau 34. Les données brutes de tous les échantillons concernant les intensités et aires spectrales obtenues en RMN du carbone-13 sont données en Annexes 7 et 8, et les intensités et aire spectrales obtenues en RMN du proton sont données en Annexes 9 et 10.

Tableau 34 – Liste des pics étudiés dans le cadre de l'étude des variations intra et inter-individuelles des constituants du tissu osseux en RMN du carbone-13 et en RMN du proton

		Gamme de déplacements chimiques	Attribution
RMN du C ¹³	Aire	170 – 185	Groupe carboxyle
		0 – 75	Chaîne aliphatique
	Intensité	182	Citrate
		173	Groupe carboxyle 1
		170	Groupe carboxyle 2
		157,5 – 157,6	Cδ Arg
		128,8 – 130	Composés aromatiques
		76	Lipides
		76	Citrate
		70,1 – 70,8	Cγ Hyp
		58,2 – 59,7	Cα Pro, Cα Hyp
		53,2 – 54	Cδ Hyp, Cα Glu
		49,2 – 50,3	Cα Ala
			Citrate
		47,1 – 47,6	Cδ Pro
		42,7 – 43,3	Cα Gly
		37,6 – 38,8	Cβ Hyp
		29,1 – 30,5	Cβ Pro, Cβ Arg
			Lipides
		24,1 – 25,2	Cγ Pro, Cβ Glu
RMN du proton	Aire	19	Acides aminés minoritaires
		16,4 – 18,8	Cβ Ala
	Intensité	12	Non attribué
		-2 – 10	Matières organique et minérale
		5,30 – 5,80	Lipides -CH=CH-
		4,10 – 4,35	Lipides CH ₂ -OCOR
		2,73 – 2,87	Lipides =HC-CH ₂ -CH
		2,25 – 2,36	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂ -
		1,93 – 2,13	Lipides (CH ₂) _n -CH=CH-
		1,55 – 1,70	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂ -
		1,20 – 1,43	Lipides (CH ₂) _n
		0,82 – 0,94	Lipides CH ₃
		0,10 – 0,20	Hydroxyapatite

Pour les variations intra-individuelles, nous étudierons les différences spectrales observées sur différents os non altérés d'un même individu. Concernant les variations inter-individuelles, nous analyserons l'influence de l'âge au décès et du sexe des sujets sur des échantillons de fémur de différents individus présentant des délais *post mortem* et des conditions de conservation identiques.

1. VARIATIONS INTRA-INDIVIDUELLES

1.1. VARIATION ENTRE DEUX OS DE MEME NATURE DU MEME INDIVIDU

Nous avons effectué les comparaisons sur les individus dont nous possédions deux os contralatéraux de même nature. Nous avons ainsi pu comparer les spectres RMN du carbone-13 (Figure 93) et du proton (Figure 94) des fémurs (droit vs. gauche) et des tibias (droit vs. gauche) d'un homme de 81 ans décédé en 1981 (MV-6) provenant de l'Inrap Grand Est nord.

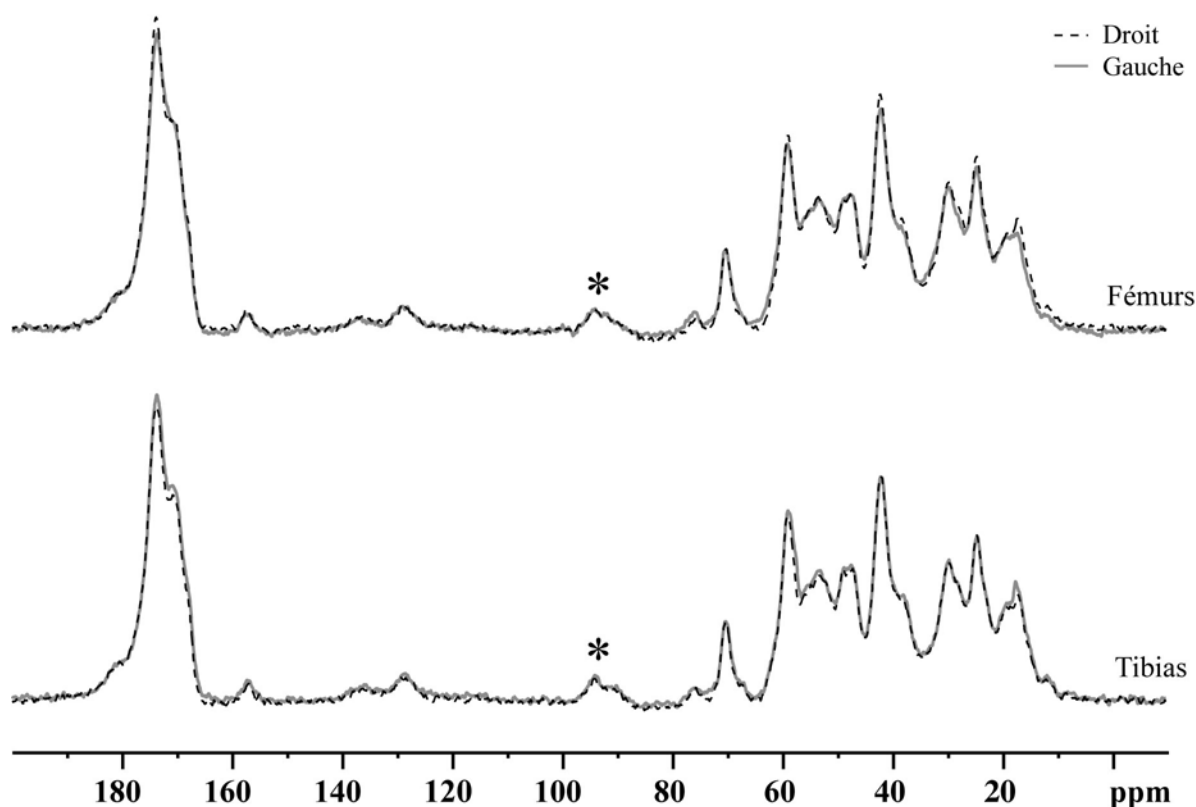


Figure 93 – Comparaison des spectres RMN du carbone-13 obtenus à partir des fémurs (droit vs. gauche) et des tibias (droit vs. gauche) de l'individu MV-6 (Inrap Grand Est nord)

* : bande de rotation

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; le fémur gauche correspond à l'échantillon MV-6-1, le fémur droit à MV-6-2, le tibia gauche à MV-6-3 et le tibia droit à MV-6-4 ; masse initiale (MV-6-1) = 112,3 mg ; masse initiale (MV-6-2) = 122,6 mg ; masse initiale (MV-6-3) = 117,8 mg ; masse initiale (MV-6-4) = 118,4 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Que ce soit pour les fémurs ou les tibias, nous pouvons constater que les profils spectraux sont très similaires attestant d'une homogénéité de composition et de proportion de la matière organique au sein de ces os indépendamment du côté choisi.

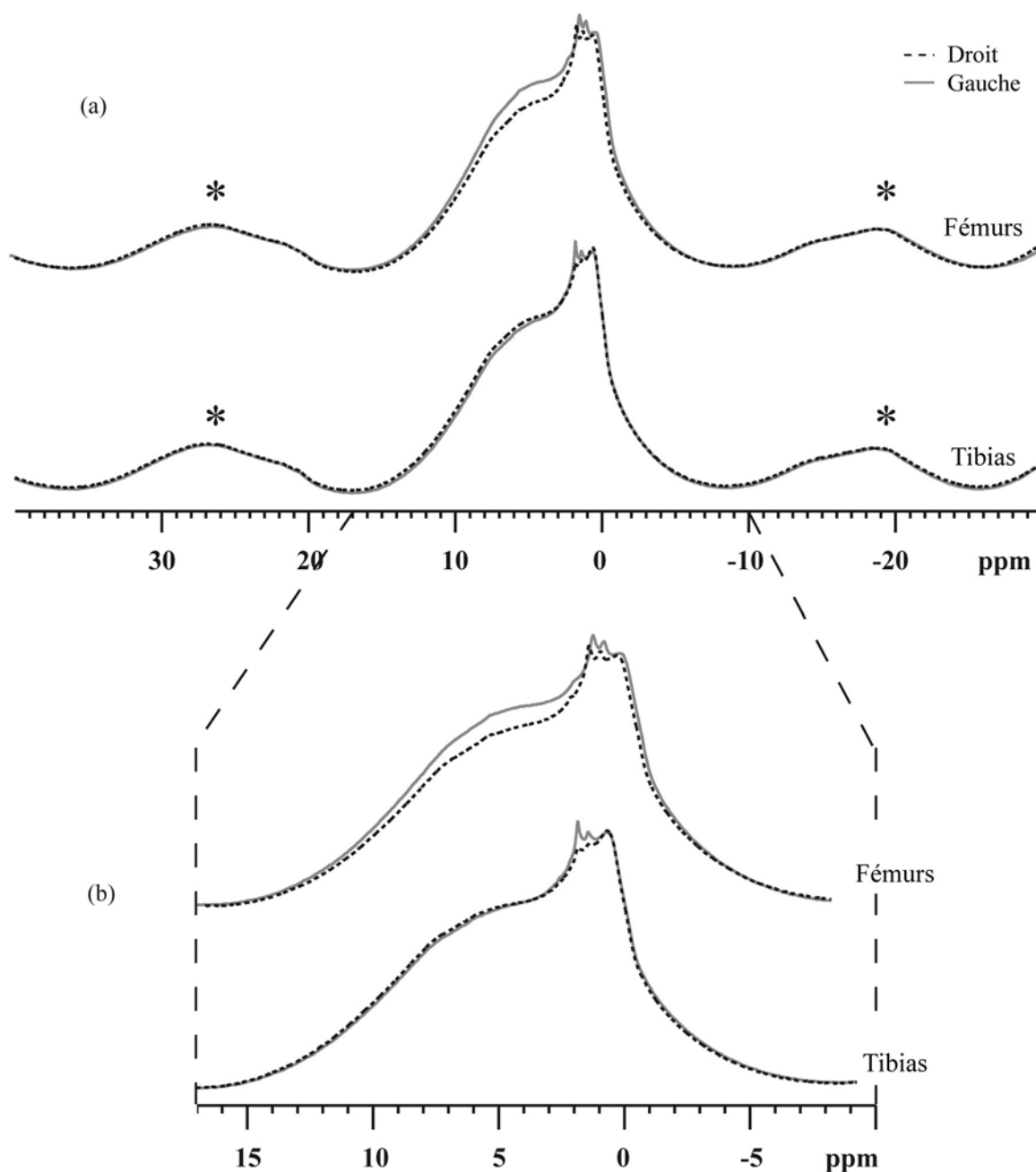


Figure 94 – Comparaison des spectres RMN du proton obtenus à partir des fémurs (droit vs. gauche) et des tibias (droit vs. gauche) de l'individu MV-6 (Inrap Grand Est nord)

(a) spectres proton avec les bandes de rotation ; (b) agrandissement de la zone spectrale d'intérêt

* : bande de rotation

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; le fémur gauche correspond à l'échantillon MV-6-1, le fémur droit à MV-6-2, le tibia gauche à MV-6-3 et le tibia droit à MV-6-4 ; masse sèche (MV-6-1) = 110,4 mg ; masse sèche (MV-6-2) = 124,3 mg ; masse sèche (MV-6-3) = 117,2 mg ; masse sèche (MV-6-4) = 115,2 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Au niveau des spectres RMN du proton, il existe une légère différence au niveau des fémurs pour la zone spectrale située entre 3 et 7 ppm.

Afin de quantifier l'écart de valeur mesuré entre les deux côtés, nous avons calculé les coefficients de variations (rapport entre l'écart-type et la moyenne) entre les os contro-latéraux à partir des aires et intensités spectrales obtenues en RMN du carbone-13 et du proton (Tableau 35).

Tableau 35 – Coefficients de variation obtenus à partir des intensités et aire spectrales des fémurs (droit vs. gauche) et des tibias (droit vs. gauche) de l'individu MV-6 (Inrap Grand Est nord)

	Carbone		Proton	
	Intensité	Aire	Intensité	Aire
Fémurs (droit vs. gauche)	8,4 %	1,7 %	3,8 %	7 %
Tibias (droit vs. gauche)	5,3 %	2,3 %	5,7 %	0 %

Les valeurs correspondent aux valeurs moyennes des coefficients de variation calculés pour l'intensité de chaque pic et l'aire de chaque massif définis dans le Tableau 34. Les intensités et aires ont été mesurées sur les spectres après application du facteur correctif afin que les masses analysées pour tous les échantillons correspondent à une masse sèche équivalente de 100 mg. Les données brutes sont fournies en Annexes 7, 8, 9 et 10.

Sur les spectres RMN du carbone-13, même si visuellement nous ne notons que peu de différences entre les spectres des fémurs et des tibias contro-latéraux, nous constatons que les coefficients de variation obtenus pour les intensités des fémurs sont importants comparés à ceux obtenus à partir des aires. Il faut noter que cette différence se traduit visuellement par la présence de pics ayant une intensité plus importante pour un fémur (le droit) mais présentant une largeur à mi-hauteur plus petite. Ces pics sont mieux résolus mais représentent quasiment la même quantité de signal ce que montre coefficient de variation obtenu au niveau des aires spectrales.

Sur les spectres RMN du proton, nous notons une différence au niveau des aires pour les fémurs ce qui corrobore la différence observée au niveau de la zone spectrale située entre 3 et 7 ppm.

Concernant les échantillons obtenus pour les os contro-latéraux de MV-13, nous n'avons pas pu mener cette analyse car certains os présentent une trace évidente d'altération (fémurs, tibias et humérus gauche) (cf. Partie 5, chapitre 5.2, page 217).

1.2. VARIATIONS ENTRE DIFFERENTS OS DU MEME INDIVIDU

Nous avons effectué les comparaisons sur les individus dont nous possédions plusieurs os de nature différente. Nous avons ainsi pu comparer les os de Sorbey-1 (fémur, tibia, humérus et côte), de MV-6 (fémurs et tibias) et de MV-13 (humérus et vertèbres), ces 3 individus provenant de l'Inrap grand Est nord.

La Figure 95 représente les spectres RMN du carbone-13 des fémur et tibia droits de MV-6.

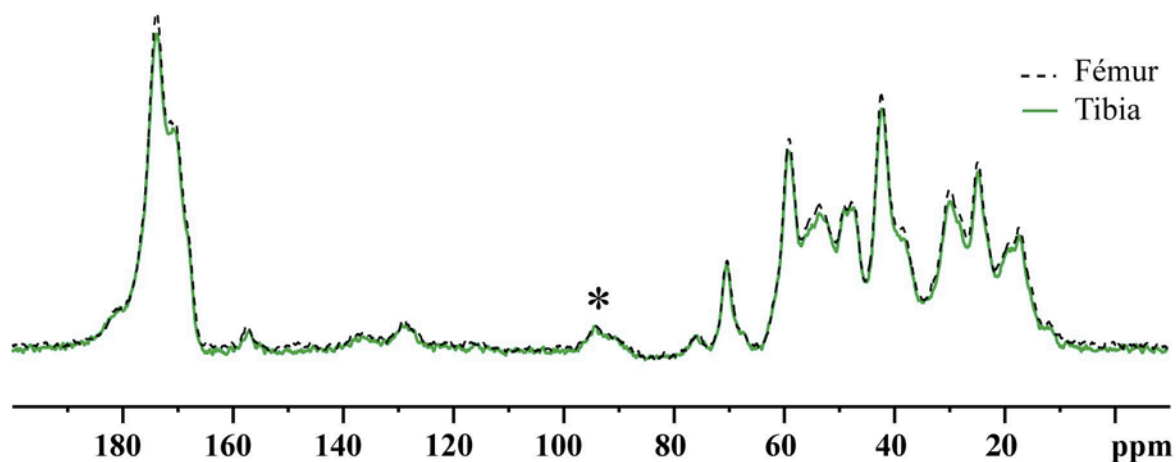


Figure 95 – Comparaison des spectres obtenus en RMN du carbone-13 à partir des fémur et tibia droits de l'individu MV-6 (Inrap Grand Est nord)

* : bande de rotation

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; le fémur droit correspond à l'échantillon MV-6-2 et le tibia droit à MV-6-4 ; masse initiale (MV-6-2) = 122,6 mg ; masse initiale (MV-6-4) = 118,4 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Les spectres des fémur et tibia apparaissent très similaires, les différences entre les deux sont minimales. Nous retrouvons la même similarité avec les spectres RMN du proton (Figure 96).

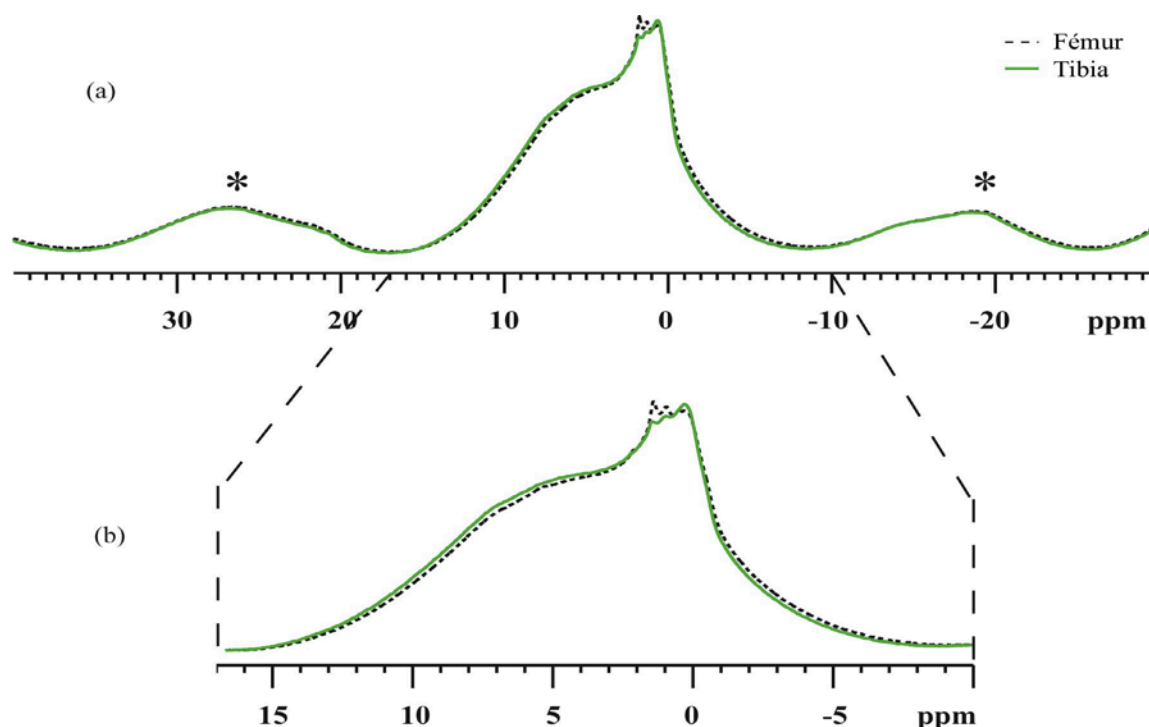


Figure 96 – Comparaison des spectres obtenus en RMN du proton à partir des fémur et tibia droits de l'individu MV-6 (Inrap Grand Est nord)

* : bande de rotation

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; le fémur droit correspond à l'échantillon MV-6-2 et le tibia droit à MV-6-4 ; masse sèche (MV-6-2) = 124,3 mg ; masse sèche (MV-6-4) = 115,2 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

La comparaison entre les humérus, vertèbre cervicale et vertèbres lombaires de MV-13 est présentée dans la Figure 97 pour les spectres RMN du carbone-13 et dans la Figure 98 pour les spectres RMN du proton.

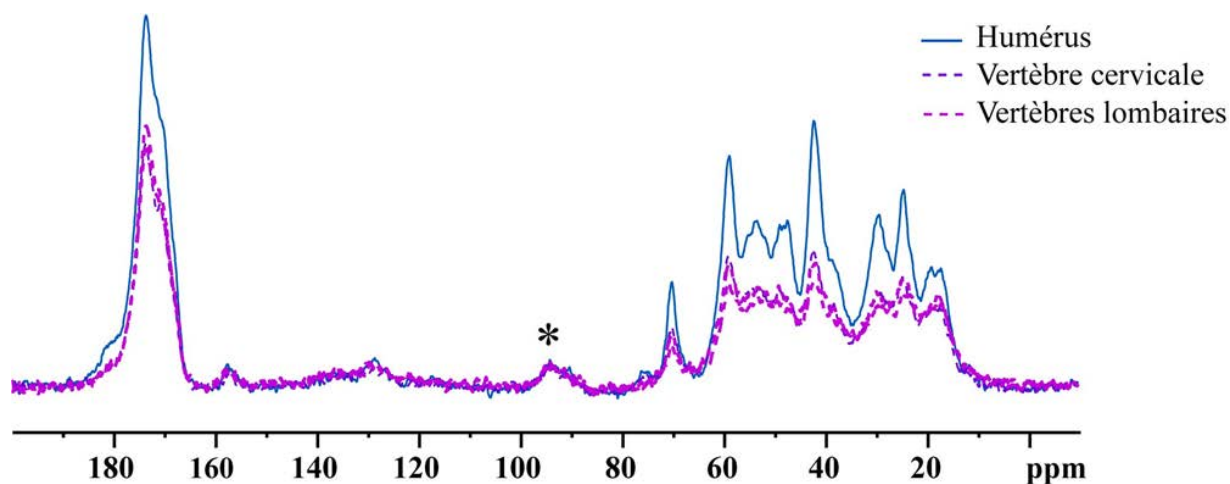


Figure 97 – Comparaison des spectres obtenus en RMN du carbone-13 à partir de l'humérus, des vertèbres cervicale et lombaires de l'individu MV-13 (Inrap Grand Est nord)

* : bande de rotation

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; l'humérus correspond à l'échantillon MV-13-5, la vertèbre cervicale à MV-13-7 et les vertèbres lombaires à MV-13-8 et MV-13-9 ; masse initiale (MV-13-5) = 115,7 mg ; masse initiale (MV-13-7) = 126,7 mg ; masse initiale (MV-13-8) = 116,9 mg ; masse initiale (MV-13-9) = 127,4 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

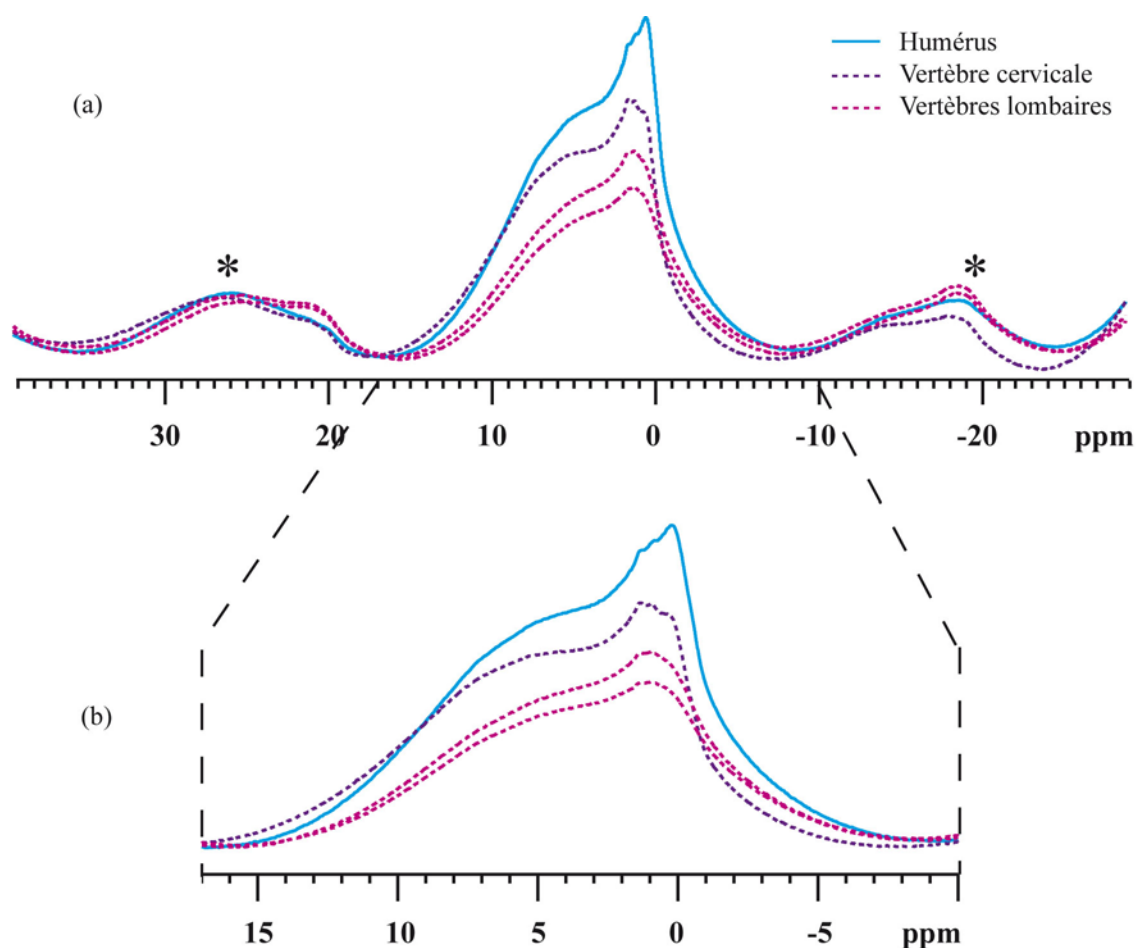


Figure 98 – Comparaison des spectres obtenus en RMN du proton à partir de l'humérus, des vertèbres cervicale et lombaires de l'individu MV-13 (Inrap Grand Est nord)

* : bande de rotation

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; l'humérus correspond à l'échantillon MV-13-5, la vertèbre cervicale à MV-13-7 et les vertèbres lombaires à MV-13-8 et MV-13-9 ; masse sèche (MV-13-5) = 113,8 mg ; masse sèche (MV-13-7) = 119,6 mg ; masse sèche (MV-13-8) = 110,5 mg ; masse sèche (MV-13-9) = 126 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

De grandes différences spectrales sont observables sur ces spectres. En RMN du carbone-13, le signal de l'humérus est nettement plus important que celui des différentes vertèbres lesquelles présentent des profils spectraux similaires. Les spectres RMN du proton apparaissent aussi

distincts, le signal le plus intense appartenant ici aussi à l'humérus. Cependant, les vertèbres possèdent aussi des différences spectrales entre elles.

La comparaison entre le fémur, le tibia, l'humérus et une côte de Sorbey-1 est présentée dans la Figure 99 pour les spectres RMN du carbone-13 et dans la Figure 100 pour les spectres RMN du proton.

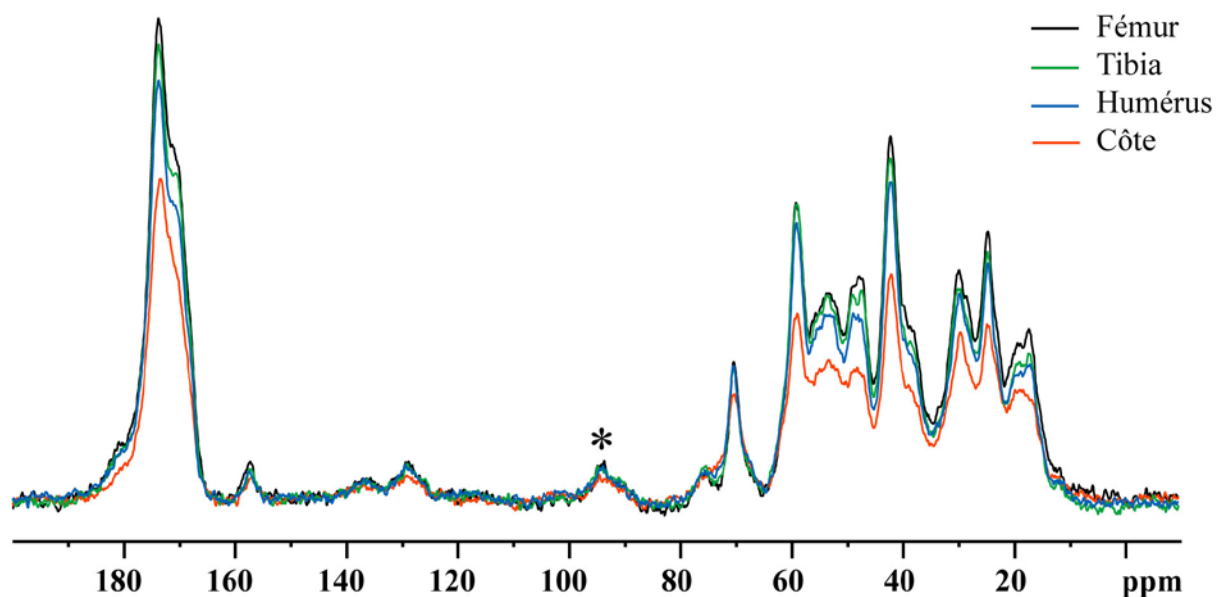


Figure 99 – Comparaison des spectres obtenus en RMN du carbone-13 à partir du fémur, tibia, humérus droits et d'une côte de l'individu Sorbey-1 (Inrap Grand Est nord)

* : bande de rotation

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; le fémur correspond à l'échantillon Sorbey-1-1, le tibia à Sorbey-1-4, l'humérus à Sorbey-1-5 et la côte à Sorbey-1-3 ; masse initiale (Sorbey-1-1) = 111,4 mg ; masse initiale (Sorbey-1-4) = 124 mg ; masse initiale (Sorbey-1-5) = 126,9 mg ; masse initiale (Sorbey-1-3) = 127,8 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

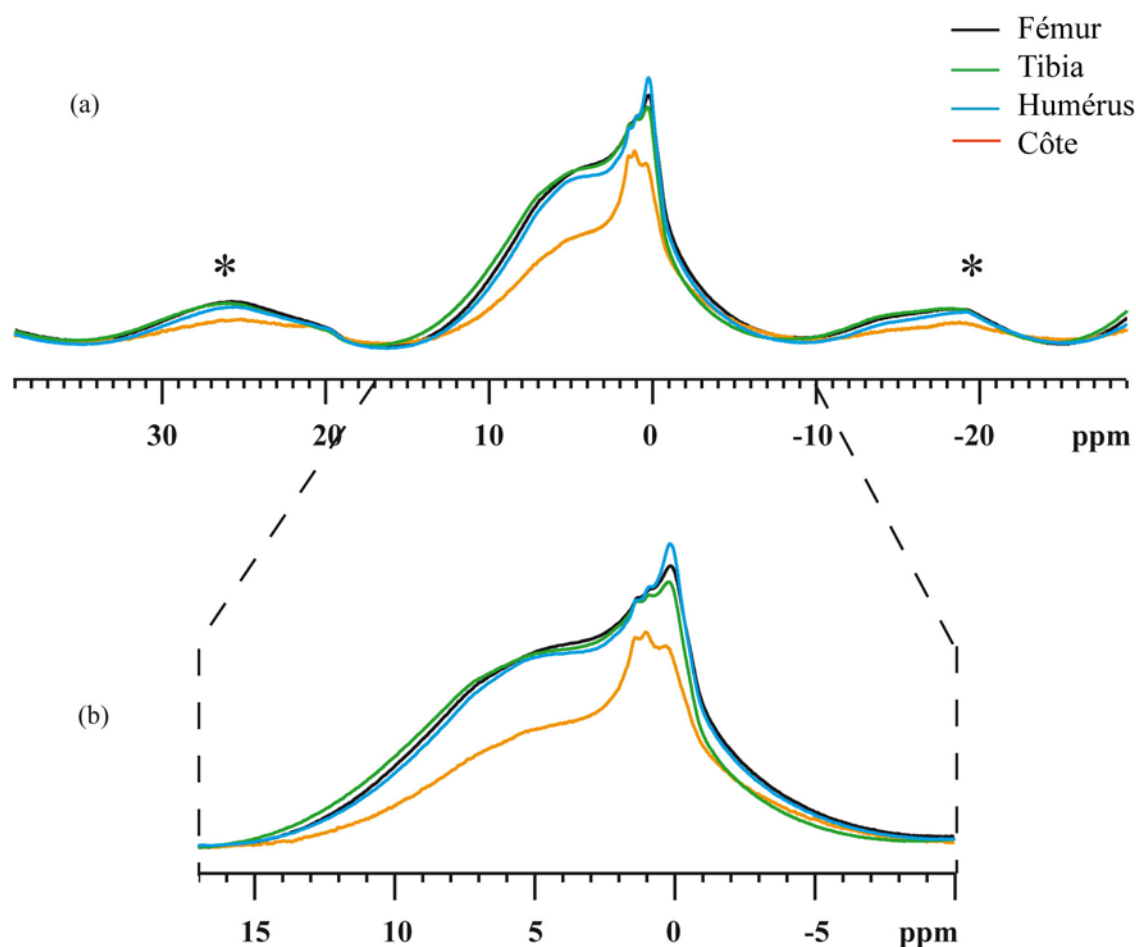


Figure 100 – Comparaison des spectres obtenus en RMN du proton à partir du fémur, tibia, humérus droits et d'une côte de l'individu Sorbey-1 (Inrap Grand Est nord)

(a) spectres proton avec les bandes de rotation ; (b) agrandissement de la zone spectrale

* : bande de rotation

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; le fémur correspond à l'échantillon Sorbey-1-1, le tibia à Sorbey-1-4, l'humérus à Sorbey-1-5 et la côte à Sorbey-1-3 ; masse sèche (Sorbey-1-1) = 116,4 mg ; masse sèche (Sorbey-1-4) = 122,4 mg ; masse sèche (Sorbey-1-5) = 127,8 mg ; masse sèche (Sorbey-1-3) = 47,6 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Nous constatons ici aussi que les spectres RMN du carbone-13 diffèrent. Le fémur et le tibia présentent les signaux les plus intenses suivi de l'humérus et de la côte. La côte présente un signal moins intense que ce soit sur les spectres RMN du carbone-13 ou du proton.

Les coefficients de variation (rapport entre l'écart-type et la moyenne) obtenus sur différents os du même individu sont présentés dans le Tableau 36.

Tableau 36 – Coefficients de variation obtenus à partir des intensités et aires spectrales de différents os des individus MV-6, MV-13 et Sorbey-1 (Inrap Grand Est nord)

	Carbone		Proton	
	Intensité	Aire	Intensité	Aire
MV-6				
Fémur vs. Tibia gauches	6,0 %	1,6 %	2,4 %	3,5 %
MV-6				
Fémur vs. Tibia droits	7,9 %	3,9 %	5,3 %	3,6 %
MV-13				
Humérus vs. Vertèbres (cervicale et lombaires)	34,0 %	26,7 %	31,3 %	22,3 %
Sorbey-1				
Fémur vs. Tibia vs. Humérus vs. Côte	17 %	16 %	9,9 %	15,7 %

Les valeurs correspondent aux valeurs moyennes des coefficients de variation calculés pour l'intensité de chaque pic et l'aire de chaque massif définis dans le Tableau 34. Les intensités et aires ont été mesurées sur les spectres après application du facteur correctif afin que les masses analysées pour tous les échantillons correspondent à une masse sèche équivalente de 100 mg. Les données brutes sont fournies en Annexes 7, 8, 9 et 10.

Nous constatons que les valeurs des coefficients de variation du sujet MV-6 sont plus faibles que les valeurs des coefficients de variation des individus MV-13 et Sorbey-1. Nous pouvons expliquer ce résultat par le fait que le calcul pour MV-6 ne prend en compte que deux variables (ici fémur vs. tibia) alors que pour MV-13 et Sorbey-1, nous en utilisons quatre ; cependant, ce n'est pas le nombre de variables pris en compte qui explique ces résultats, il s'agit plutôt de la nature de l'os analysé.

Nous avons voulu comparer tous les échantillons précédents en termes d'aire des chaînes aliphatiques (Figure 101), des groupes carboxyle (Figure 102) et du spectre proton (Figure 103).

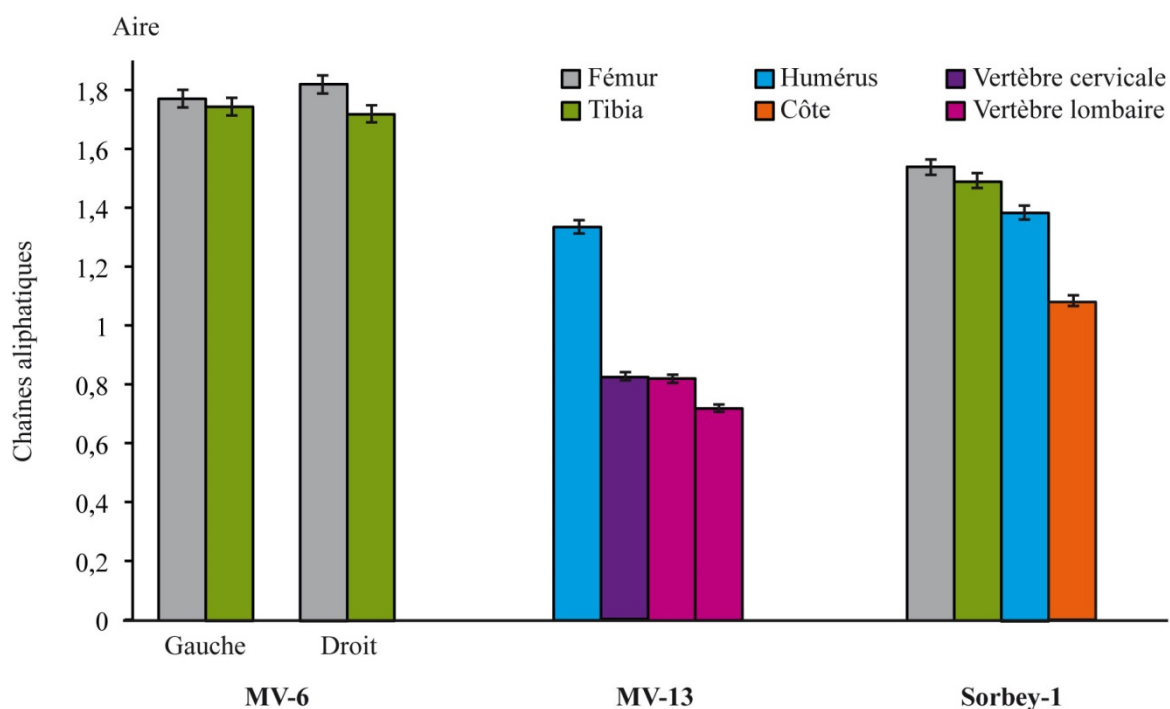


Figure 101 – Diagramme en barres représentant l'aire des chaînes aliphatiques obtenue en RMN du carbone-13 de différents os des individus MV-6, MV-13 et Sorbey-1 (Inrap Grand Est nord)

La barre d'erreur verticale correspond à l'intervalle de confiance de la mesure de $\pm 1,7\%$.

Ce diagramme permet de visualiser les aires des chaînes aliphatiques obtenues en RMN du carbone-13 et de confirmer le peu de variation que nous observons entre les fémurs et les tibias de MV-6 et de MV-13. Nous constatons aussi que les vertèbres et la côte présentent des aires fortement diminuées comparées à celles des fémurs et tibias voire même aux humérus.

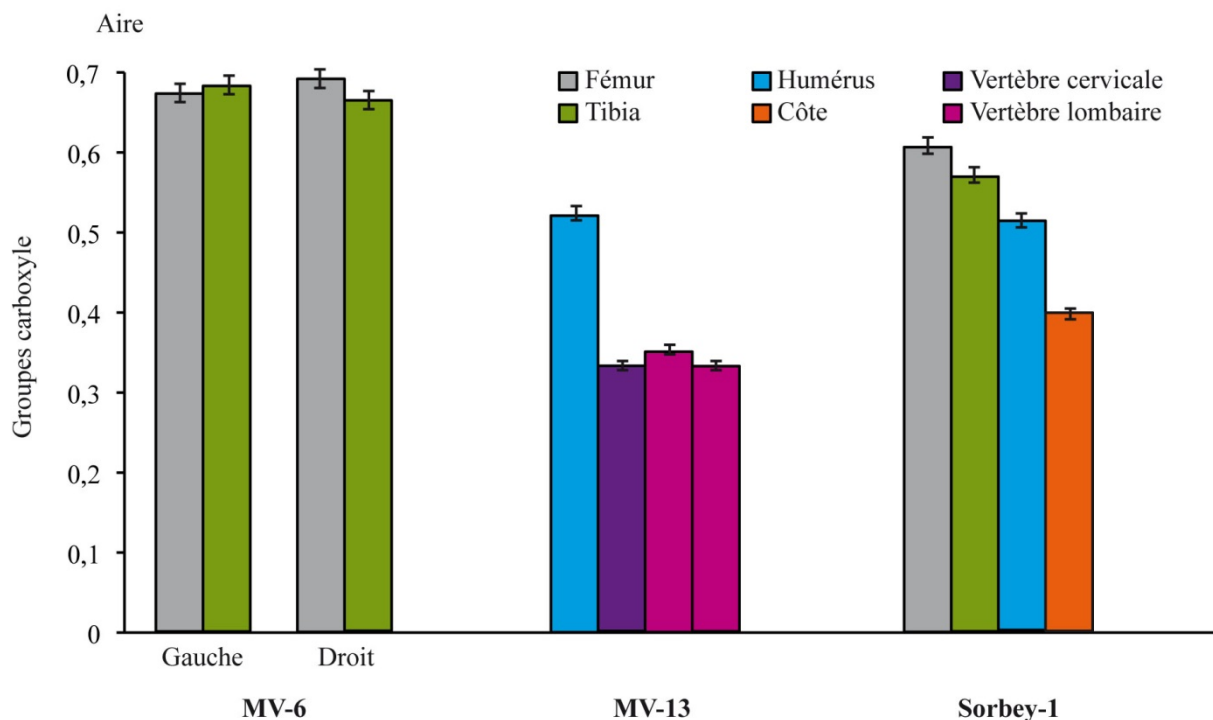


Figure 102 – Diagramme en barres représentant l'aire des groupes carboxyle obtenue en RMN du carbone-13 de différents os des individus MV-6, MV-13 et Sorbey-1 (Inrap Grand Est nord)

La barre d'erreur verticale correspond à l'intervalle de confiance de la mesure de $\pm 1,7 \%$.

Ces résultats sont comparables à ceux que nous avons observés au niveau des chaînes aliphatiques.

En RMN du carbone-13, il existe donc des différences au niveau des aires spectrales liées à la nature de l'os étudié. Les os présentant le meilleur signal sont les fémurs et les tibias. Comme les aires des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle reflètent principalement le signal du collagène de type I, nous constatons que la quantité de collagène varie en fonction de l'os considéré, les os présentant un os cortical épais tels les fémurs et tibias ont une aire plus importante. Nous allons maintenant voir le diagramme en barre de l'aire obtenue en RMN du proton (Figure 103).

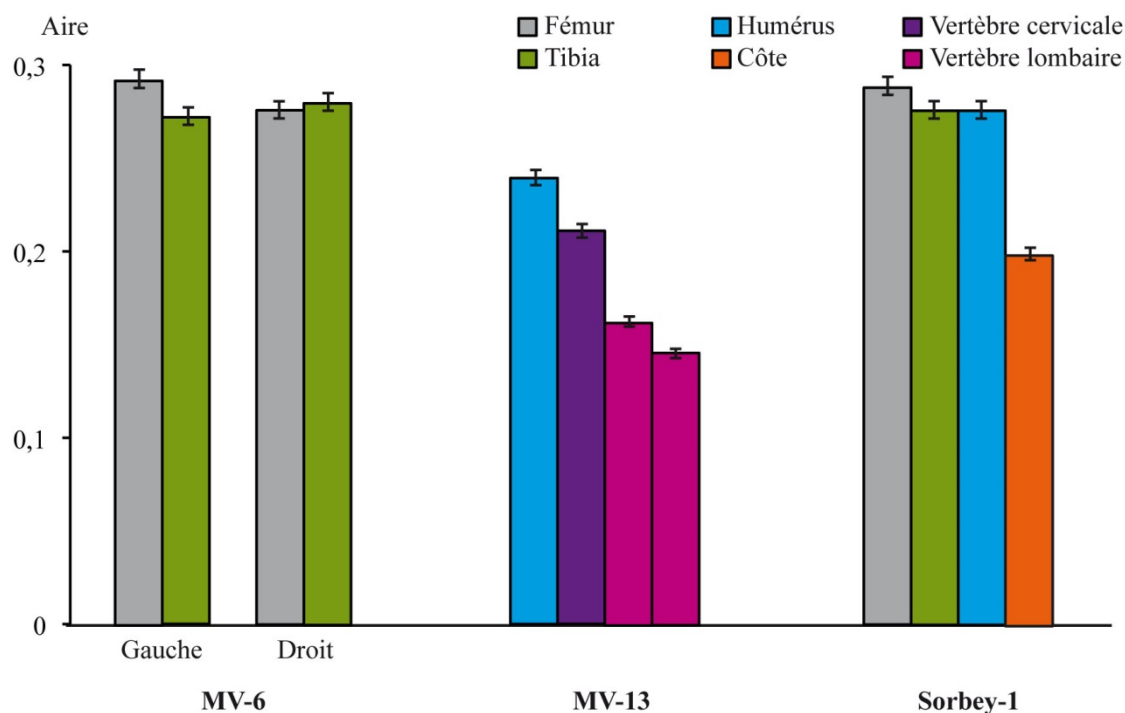


Figure 103 – Diagramme en barres représentant l'aire obtenue en RMN du proton de différents os des individus MV-6, MV-13 et Sorbey-1 (Inrap Grand Est nord)

La barre d'erreur verticale correspond à l'intervalle de confiance de la mesure de $\pm 1,7\%$.

En RMN du proton, le fémur reste l'os présentant le signal le plus intense ; les os tels les vertèbres et la côte présentent un signal diminué.

1.3. SYNTHÈSE SUR LES VARIATIONS INTRA-INDIVIDUELLES

Nous constatons qu'il existe une homogénéité entre les signaux provenant de deux os contralatéraux d'un même individu. Au sein des os d'un même individu, nous notons un signal plus intense pour les fémurs, sensiblement identique à celui provenant des tibias, et nettement supérieur à celui des humérus et enfin celui des os courts tels les vertèbres ou les côtes.

Pour la suite de notre étude, nous privilégierons donc l'analyse des fémurs puisque ce sont les os qui présentent un signal le plus intense quel que soit l'individu concerné et il présente une homogénéité d'intensité quel que soit le côté choisi.

2. VARIATIONS INTER-INDIVIDUELLES

Pour tester l'influence de l'âge au décès et du sexe, nous avons utilisé des collections homogènes en termes de conditions de conservation et d'intervalles *post mortem*. Ainsi nous avons travaillé sur la collection du laboratoire d'anatomie de l'Université Libre de Bruxelles (BRUULB) représentée par 16 individus dont les dates de décès sont 2011 et 2012 ; sur un sous échantillon de la collection Milan MIL (l'individu MIL-L1F a été exclu car sa date de décès diffère de celle des autres individus de la collection) représentée par 15 individus dont les dates de décès sont 1991 et 1992 ; et sur un sous échantillon (17 individus) de la collection de l'IRCGN, dont les dates de décès sont comprises entre 1936 et 1942. Tous ces individus ne présentent pas de modification spectrale secondaire à une transformation adipocireuse (cf. partie 5, chapitre 5.2, page 217).

Dans un premier temps, nous allons présenter les données brutes (les spectres) obtenues en RMN du carbone-13. Nous analyserons ces données grâce aux aires et aux intensités spectrales mais aussi au moyen de tests statistiques qui nous permettront ou non de mettre en évidence des corrélations entre les aires et les intensités spectrales en fonction de l'âge au décès et du sexe des sujets.

Dans un second temps, nous réaliserons la même analyse avec les spectres obtenus en RMN du proton.

2.1. ÉTUDE PAR RMN DU CARBONE-13 DES SOUS ÉCHANTILLONS DES COLLECTIONS BRUULB, IRCGN ET MILAN

2.1.1. Analyse des spectres

Nous avons représenté dans la Figure 104 les spectres obtenus en RMN du carbone-13 des 16 individus de la collection BRUULB. Les spectres RMN du carbone-13 des deux autres collections utilisées dans ce chapitre sont fournis en Annexes 11 et 12.

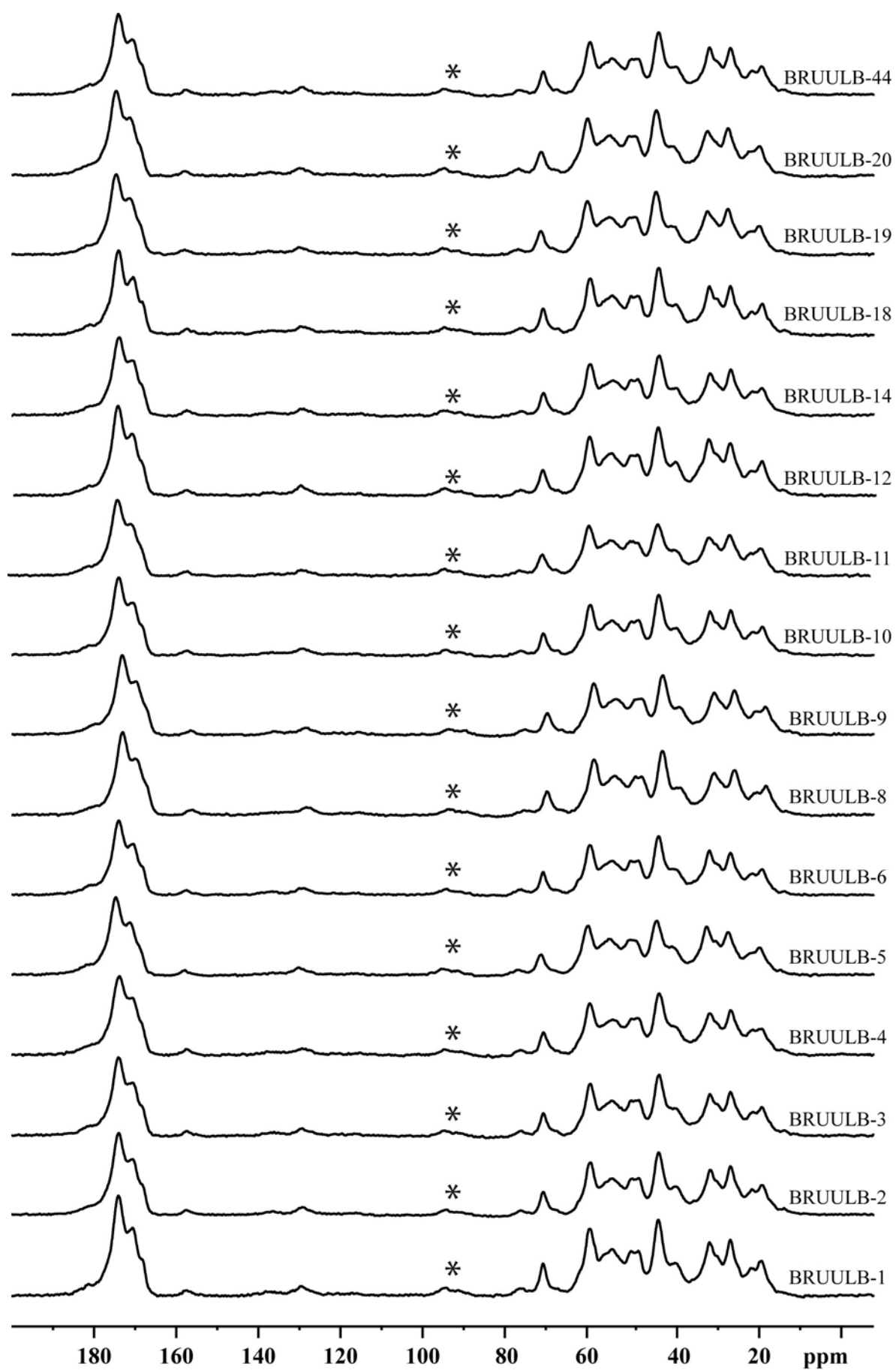


Figure 104 – Spectres RMN du carbone-13 des 16 individus de la collection BRU-ULB utilisés pour l'étude de l'influence des facteurs « âge au décès » et « sexe »

* : bande de rotation

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; masse initiale (BRUULB-1) = 113,3 mg ; masse initiale (BRUULB-2) = 148,8 mg ; masse initiale (BRUULB-3) = 126 mg ; masse initiale (BRUULB-4) = 116,4 mg ; masse initiale (BRUULB-5) = 136,3 mg ; masse initiale (BRUULB-6) = 141 mg ; masse initiale (BRUULB-8) = 129,1 mg ; masse initiale (BRUULB-9) = 137,4 mg ; masse initiale (BRUULB-10) = 148,5 mg ; masse initiale (BRUULB-11) = 129,2 mg ; masse initiale (BRUULB-12) = 143,4 mg ; masse initiale (BRUULB-14) = 127,4 mg ; masse initiale (BRUULB-18) = 129,7 mg ; masse initiale (BRUULB-19) = 136,4 mg ; masse initiale (BRUULB-20) = 122,4 mg ; masse initiale (BRUULB-44) = 136,9 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Les profils spectraux des 16 individus de la collection BRUULB sont similaires. Il est très difficile visuellement de mettre en évidence des différences. Il en est de même avec les deux autres collections présentées en Annexes 11 et 12. Nous allons donc analyser les aires et les intensités spectrales mesurées dans chaque collection afin d'obtenir une comparaison plus fine entre ces individus.

2.1.2. Analyse des aires spectrales

Nous avons mesuré les aires spectrales des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle de chaque individu des trois collections. Nous les avons représentées en fonction de l'âge au décès des sujets et de leur sexe dans la Figure 105 pour la collection BRUULB, dans la Figure 106 pour la collection MIL et dans la Figure 107 pour la collection IRCGN.

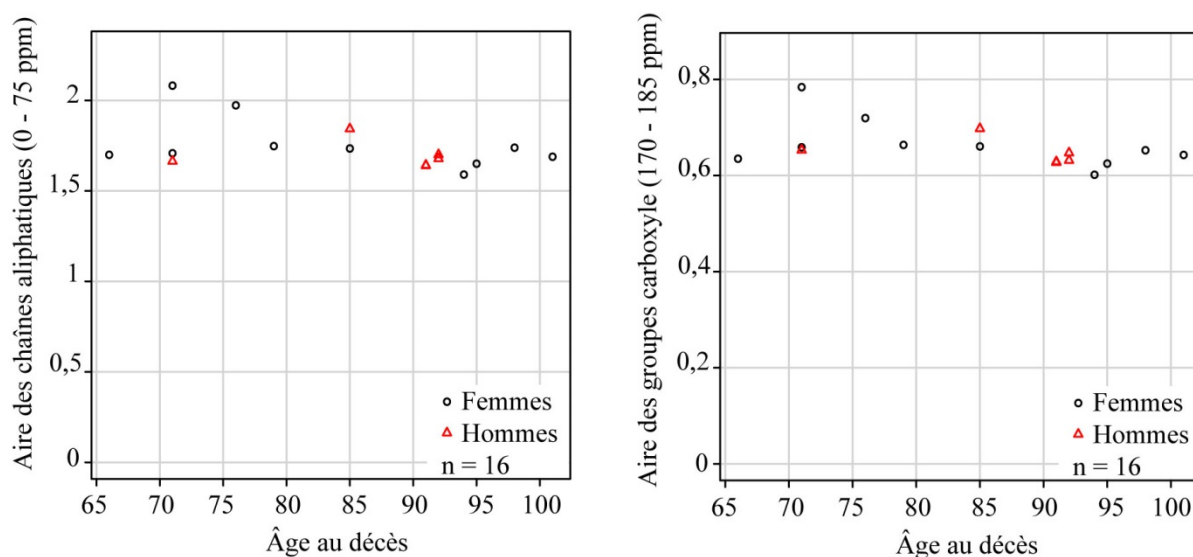


Figure 105 – Représentation graphique des aires des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle obtenues en RMN du carbone-13 en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection BRUULB (n = 16)

L'intervalle de confiance de la mesure ($\pm 1,7$ %) est compris dans la taille du symbole.

Les aires des chaînes aliphatiques et de groupes carboxyle sont stables en fonction de l'âge au décès. Leurs valeurs apparaissent constantes avec peu de variabilité, elles sont comprises entre 1,59 et 2,08 ppm pour les chaînes aliphatiques et entre 0,60 et 0,78 pour les groupes carboxyle. De plus, nous n'observons pas de différence entre les femmes et les hommes.

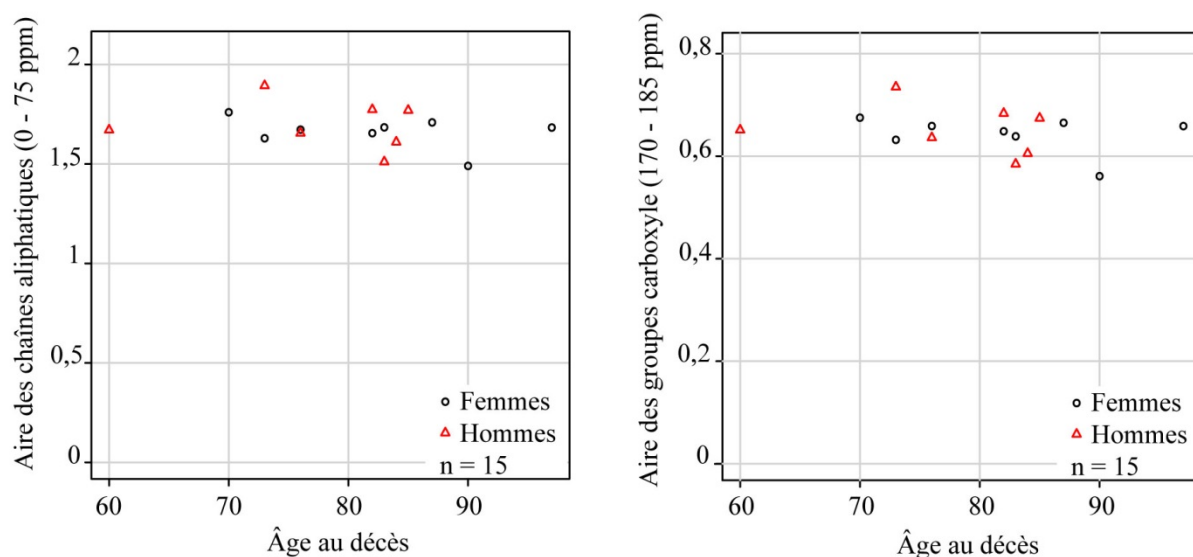


Figure 106 – Représentation graphique des aires des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle obtenues en RMN du carbone-13 en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection MIL (n = 15)

L'intervalle de confiance de la mesure ($\pm 1,7\%$) est compris dans la taille du symbole.

Pour la collection MIL, il n'y a pas non plus de différences majeures entre les aires obtenues chez les femmes et chez les hommes en fonction de leur âge au décès. Les valeurs pour les aires des chaînes aliphatiques sont comprises entre 1,49 et 1,89 ppm, et pour les groupes carboxyle entre 0,56 et 0,73 ppm.

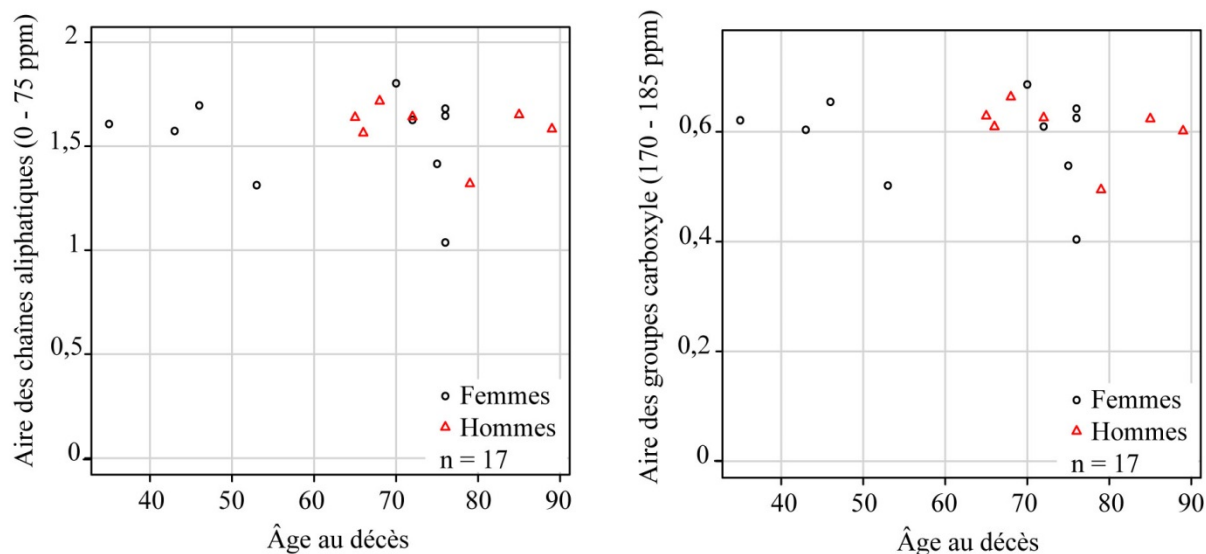


Figure 107 – Représentation graphique des aires des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle obtenues en RMN du carbone-13 en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection IRCGN ($n = 17$)

L'intervalle de confiance de la mesure ($\pm 1,7\%$) est compris dans la taille du symbole.

Pour la collection IRCGN, nous notons une légère augmentation de la variabilité des mesures en fonction de leur âge au décès. Les valeurs pour les aires des chaînes aliphatiques sont comprises entre 1,04 et 1,80 ppm, et pour les groupes carboxyle entre 0,40 et 0,69 ppm.

Nous pouvons noter au sein de trois collections que l'âge au décès et le sexe des individus ne semblent pas influencer les aires des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle. La comparaison des trois collections permet d'observer que les valeurs obtenues pour la collection BRUULB sont supérieures à celles obtenues pour la collection MIL, elles-mêmes supérieures à celles de la collection IRCGN.

Afin de vérifier ces résultats, nous avons utilisé le test de Wilcoxon qui est un test statistique non paramétrique pouvant être employé sur de petits échantillons et qui permet de tester l'influence du sexe indépendamment de l'âge sur la valeur des aires et intensités spectrales mesurées. Nous avons aussi utilisé un test simple de corrélation linéaire nous permettant cette fois de tester l'influence de l'âge indépendamment du sexe sur ces mêmes variables (Tableau 37).

Tableau 37 – Résultats des tests de Wilcoxon et de corrélation concernant les aires des groupes carboxyle et des chaînes aliphatiques obtenues par RMN du carbone-13 pour la collection BRUULB, et les sous échantillons des collections MIL et IRCGN

Aire	Collection								
	BRUULB			MIL			IRCGN		
	Test de Wilcoxon								
	p	R ²		p	R ²		p	R ²	
		F	H		F	H		F	H
Groupes carboxyle	0,49	0,25	0,14	0,78	0,10	0,07	0,63	0,04	0,12
Chaînes aliphatiques	0,22	0,24	0,01	0,69	0,12	0,03	0,57	0,03	0,06
	Test de corrélation								
	p	R ²		p	R ²		p	R ²	
Groupes carboxyle	0,05*	0,25		0,28	0,09		0,57	0,20	
Chaînes aliphatiques	0,08	0,20		0,33	0,07		0,70	0,01	

F : femmes ; H : hommes ; p : *p*-valeur donnant la probabilité au seuil $\alpha = 5\%$; **p*** indique une *p*-valeur inférieure ou égale à 0,05 ; R² : coefficient de détermination ; les données brutes sont fournies en Annexe 8.

Nous constatons que quelle que soit la collection, le test de Wilcoxon fournit des résultats non significatifs attestant que le sexe des sujets n'influence pas la valeur des aires spectrales mesurées. En revanche, pour une collection (BRUULB), le test de corrélation donne des résultats significatifs pour les groupes carboxyle indiquant que l'âge des sujets influence ces données. Cependant, le coefficient de détermination reste faible ($R^2 = 0,25$) à la vue de l'effectif étudié ($n = 16$) indiquant que la corrélation à l'âge n'est pas très forte. Ces résultats confirment donc que les facteurs âge au décès et sexe n'influencent pas de manière significative la mesure des aires des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle.

2.1.3. Analyse des intensités spectrales

Nous allons observer le comportement des intensités spectrales des individus de nos trois collections au travers de l'analyse graphique de 3 pics distincts :

- Le pic résonnant entre 42,7 et 43,3 ppm, attribuable au C α de la glycine. En effet, il s'agit de l'acide aminé le plus abondant au sein du collagène et du pic le plus intense ;
- Le pic résonnant entre 29,1 et 30,5 ppm, attribuable au C β de la proline, au C β de l'arginine et aux groupes méthylène des lipides. Ce pic est intéressant car il reflète en partie le comportement des lipides ;
- Le pic résonnant vers 173 ppm, attribuable au groupe carboxyle le plus intense.

Les représentations graphiques de ces trois pics sont données dans la Figure 108 pour la collection BRUULB et dans la Figure 109 et la Figure 110 pour les collections MIL et IRCGN respectivement.

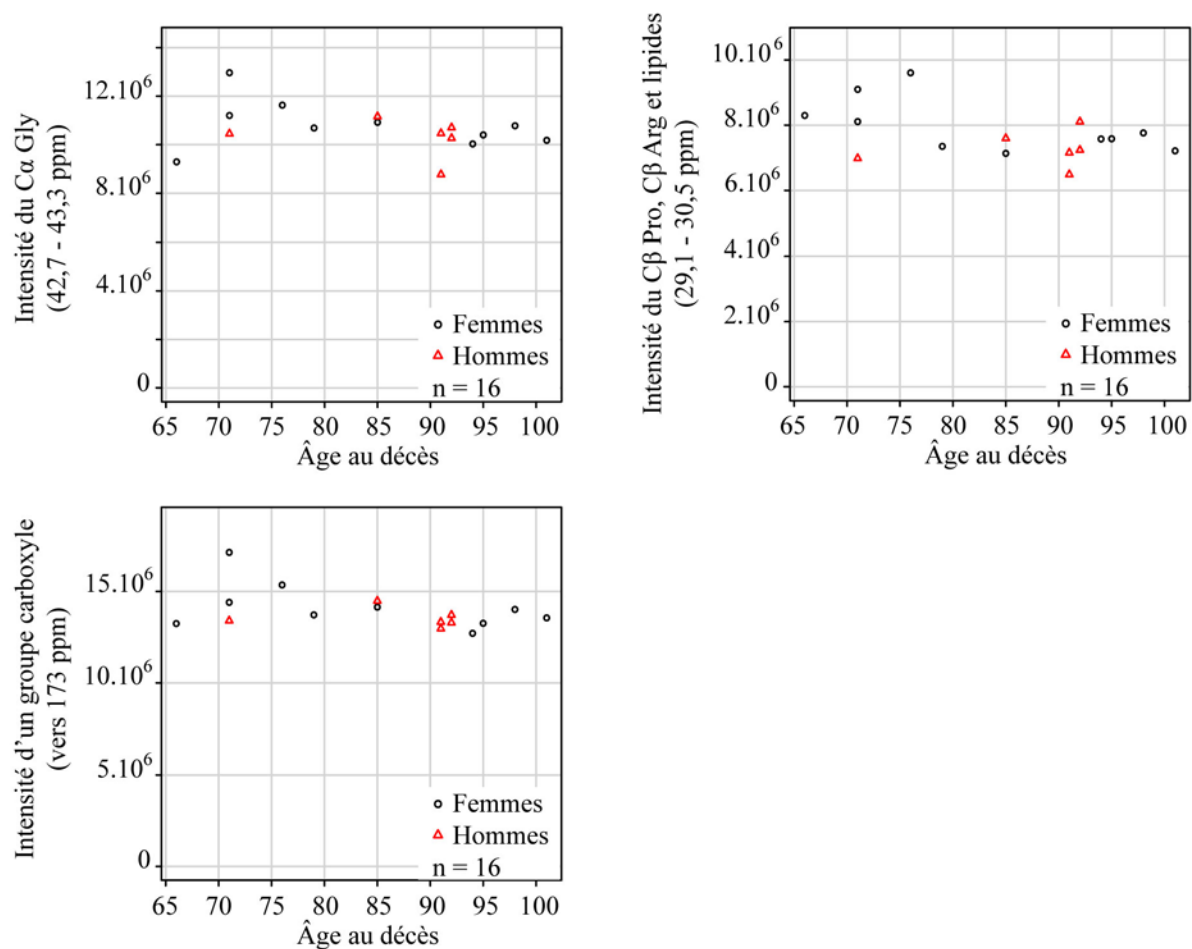


Figure 108 – Représentation graphique de l'intensité de 3 pics de résonance obtenus par RMN du carbone-13 en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection BRUULB (n = 16)

L'intervalle de confiance de la mesure ($\pm 1,7\%$) est compris dans la taille du symbole.

Les intensités spectrales de ces 3 pics présentent des comportements similaires que ce soit pour les femmes ou pour les hommes, et ce quel que soit l'âge. Il semblerait même que la variabilité des intensités mesurées diminue avec l'âge.

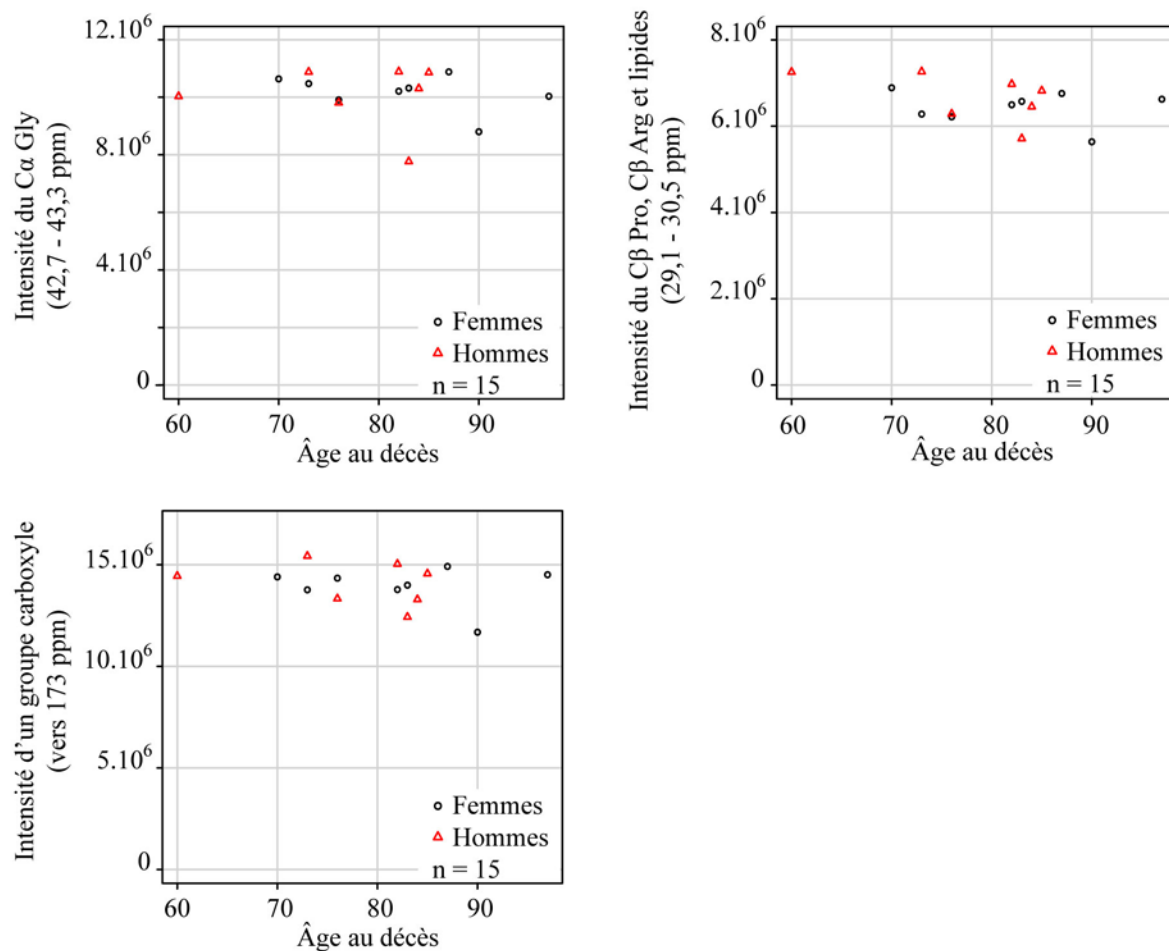


Figure 109 – Représentation graphique de l'intensité de 3 pics de résonance obtenus par RMN du carbone-13 en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection MIL ($n = 15$)

L'intervalle de confiance de la mesure ($\pm 1,7\%$) est compris dans la taille du symbole.

Les intensités pour la collection MIL ne montrent pas non plus de différence entre les femmes et les hommes quel que soit leur âge au décès.

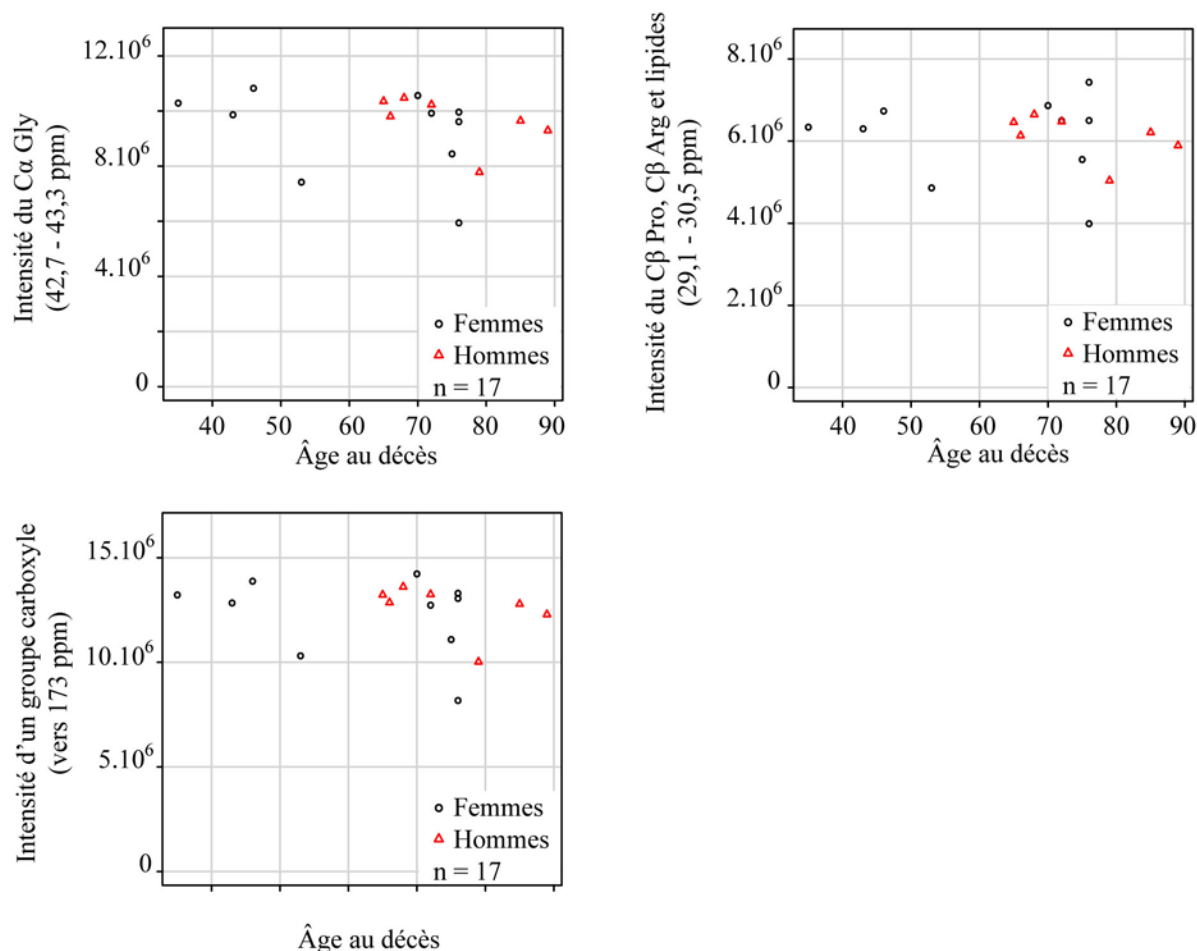


Figure 110 – Représentation graphique de l'intensité de 3 pics de résonance obtenus par RMN du carbone-13 en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection IRCGN ($n = 17$)

L'intervalle de confiance de la mesure ($\pm 1,7 \%$) est compris dans la taille du symbole.

Enfin, comme pour les aires des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle, cette collection présente des valeurs ayant une grande variabilité entre les individus. Cependant, cette variabilité ne semble liée ni à l'âge au décès des sujets ni à leur sexe

Nous avons appliqué les mêmes tests aux intensités spectrales que nous avons identifiées sous la forme de 18 pics distincts. Nous n'avons pas pris en compte l'existence de pics présents chez trop peu d'individus (seulement une ou deux occurrences par collection). Les résultats du test de Wilcoxon sont présentés dans le Tableau 38, et ceux du test de corrélation dans le Tableau 39.

Tableau 38 – Résultats du test de Wilcoxon concernant les intensités des pics obtenus par RMN du carbone-13 pour la collection BRUULB, et les sous échantillons des collections MIL et IRCGN

Gamme de déplacements chimiques	Attribution	Collection								
		BRUULB			MIL			IRCGN		
		p	R ²		p	R ²		p	R ²	
			F	H		F	H		F	H
182	Citrate	0,71	0,31	0,01	0,54	<0,01	0,06	0,61	0,12	0,10
173	Groupes carboxyle	0,43	0,23	0,02	0,69	0,03	0,09	0,76	0,07	0,19
170		0,96	0,25	0,31	1	0,03	0,07	0,17	0,19	0,02
157,5 – 157,6	Cδ Arg	0,87	0,61	0,29	0,28	0,11	0,31	0,41	0,06	0,08
128,8 – 130	Composés aromatiques	0,31	0,19	0,09	0,54	<0,01	0,18	0,27	0,10	0,06
	Lipides									
76	Citrate	0,87	0,01	<0,01	0,87	0,05	0,18	0,06	0,01	0,01
70,1 – 70,8	Cγ Hyp	0,56	0,10	<0,01	0,78	0,03	<0,01	0,76	0,07	0,16
58,2 – 59,7	Cα Pro, Cα Hyp	0,71	0,15	0	0,69	0,10	<0,01	0,76	0,07	0,19
53,2 – 54	Cδ Hyp, Cα Glu	0,22	0,28	0	0,96	0,05	<0,01	0,97	0,05	0,08
49,2 – 50,3	Cα Ala	0,72	0,21	0,77	0,53	0,03	0,05	0,64	0,20	0,61
	Citrate									
47,1 – 47,6	Cδ Pro	0,26	0,48	0,24	1	0,28	0,37	0,87	<0,01	0,10
42,7 – 43,3	Cα Gly	0,49	0,10	0,05	0,87	0,16	<0,01	0,76	0,10	0,28
37,6 – 38,8	Cβ Hyp	0,37	0,36	0,17	0,28	0,01	0,12	0,76	0,01	0,13
29,1 – 30,5	Cβ Pro, Cβ Arg	0,09	0,37	0,04	0,28	0,03	0,29	0,90	<0,01	0,23
	Lipides									
24,1 – 25,2	Cγ Pro, Cβ Glu	0,37	0,15	0	1	0,02	<0,01	0,90	0,07	0,14
19	Acides aminés minoritaires	0,49	0,09	0,66	0,69	0,01	0,04	0,32	0,05	0,06
16,4 – 18,8	Cβ Ala	0,22	0,11	0,38	0,78	0,04	0,02	0,90	0,07	0,32
12	Non attribué	0,90	0,14	0,15	0,87	0,20	0,03	0,88	0,42	0,61

F : femmes ; H : hommes ; p : *p*-valeur donnant la probabilité au seuil $\alpha = 5\%$; R² : coefficient de détermination ; les données brutes sont fournies en Annexe 7.

Les résultats du test de Wilcoxon ne sont pas significatifs pour tous les pics testés, le facteur âge au décès n'influence donc pas les valeurs des intensités spectrales mesurées ce qui confirme nos premières observations.

Tableau 39 – Résultats du test de corrélation concernant les intensités des pics obtenus par RMN du carbone-13 pour la collection BRUULB, et les sous échantillons des collections MIL et IRCGN

Gamme de déplacements chimiques	Intensité	Collection					
		BRUULB		MIL		IRCGN	
	Attribution	p	R ²	p	R ²	p	R ²
182	Citrate	0,08	0,20	0,75	<0,01	0,69	0,01
173	Groupes carboxyles	0,08	0,20	0,37	0,06	0,38	0,05
170		0,04*	0,27	0,40	0,05	0,26	0,13
157,5 – 157,6	Cδ Arg	0,04*	0,28	0,58	0,02	0,47	0,04
128,8 – 130	Composés aromatiques	0,21	0,11	0,33	0,07	0,18	0,12
	Lipides						
76	Citrate	0,84	<0,01	0,34	0,07	0,27	0,08
70,1 – 70,8	Cγ Hyp	0,26	0,09	0,74	<0,01	0,48	0,03
58,2 – 59,7	Cα Pro, Cα Hyp	0,18	0,12	0,46	0,04	0,45	0,04
53,2 – 54	Cδ Hyp, Cα Glu	0,08	0,21	0,70	0,01	0,49	0,03
49,2 – 50,3	Cα Ala	0,07	0,27	0,76	<0,01	0,18	0,19
	Citrate						
47,1 – 47,6	Cδ Pro	0,03*	0,36	0,88	<0,01	0,81	<0,01
42,7 – 43,3	Cα Gly	0,23	0,10	0,53	0,03	0,31	0,07
37,6 – 38,8	Cβ Hyp	0,02*	0,34	0,96	<0,01	0,64	0,01
29,1 – 30,5	Cβ Pro, Cβ Arg	0,07	0,22	0,12	0,18	0,62	0,02
	Lipides						
24,1 – 25,2	Cγ Pro, Cβ Glu	0,18	0,12	0,71	0,01	0,39	0,05
19	Acides aminés minoritaires	0,24	0,10	0,59	0,02	0,59	0,02
16,4 – 18,8	Cβ Ala	0,44	0,04	0,58	0,02	0,26	0,08
12	Non attribué	0,46	0,04	0,40	0,06	0,03*	0,31

R² : coefficient de détermination ; p : *p*-valeur donnant la probabilité au seuil $\alpha = 5\%$; **p*** indique une *p*-valeur inférieure ou égale à 0,05 ; les données brutes sont fournies en Annexe 7.

Au sein de la collection BRUULB, le test de corrélation donne des résultats significatifs pour 4 attributions sur 18, indiquant que l'âge des sujets aurait une influence sur la valeur de ces intensités spectrales. Cependant les coefficients de détermination liés aux tests de corrélation significatifs ne sont pas très importants ($0,27 < R^2 < 0,36$). La corrélation qui existe n'est donc pas très forte.

Pour la collection de MIL, nous constatons que les résultats des tests de Wilcoxon et de corrélation ne sont pas significatifs pour tous les pics que nous avons pris en compte dans cette étude. Les facteurs âge et sexe n'influencent donc pas l'intensité des pics mesurée au sein de cette collection.

Concernant le sous échantillon de la collection IRCGN, les résultats ne sont pas non plus significatifs avec le test de Wilcoxon et un seul pic (12 ppm) présente des résultats significatifs pour le test de corrélation avec un coefficient de détermination faible (0,31).

Au sein de nos trois collections, les facteurs âge au décès et sexe n'ont que peu d'influence sur les aires et les intensités spectrales mesurées obtenues en RMN du carbone-13. Nous allons maintenant voir s'il en est de même en RMN du proton.

2.2. ANALYSES EN RMN DU PROTON

2.2.1. Analyse des spectres

Nous avons représenté dans la Figure 111 les spectres obtenus en RMN du proton des 16 individus de la collection BRUULB. Les spectres proton des deux autres collections sont présentés en Annexes 13 et 14.

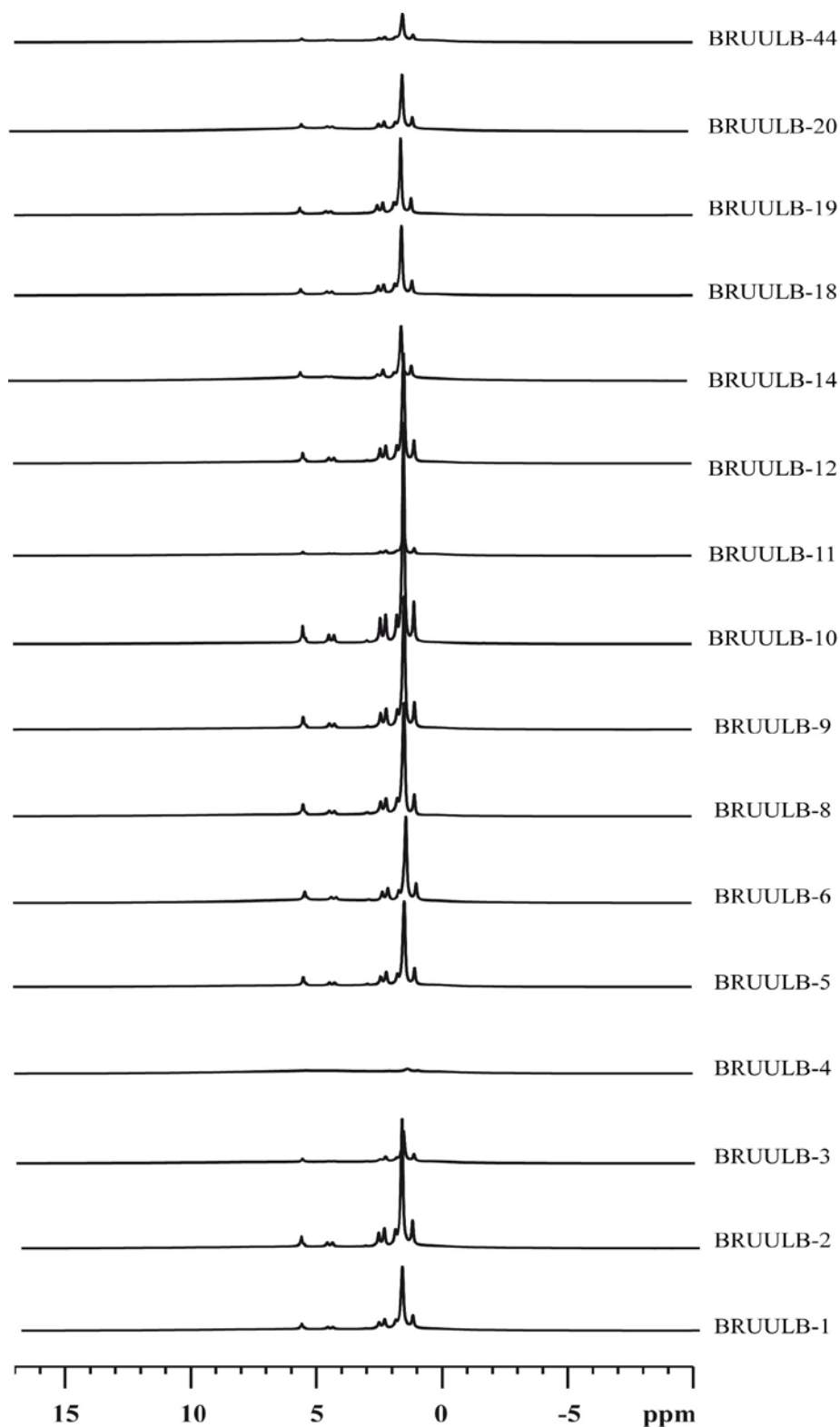


Figure 111 – Spectres RMN du proton des 16 individus de la collection BRU-ULB utilisés pour l'étude de l'influence des facteurs « âge au décès » et « sexe »

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; masse sèche (BRUULB-1) = 132,3 mg ; masse sèche (BRUULB-2) = 147,4 mg ; masse sèche (BRUULB-3) = 126,6 mg ; masse sèche (BRUULB-4) = 117,7 mg ; masse sèche (BRUULB-5) = 138,4 mg ; masse sèche (BRUULB-6) = 138,7 mg ; masse sèche (BRUULB-8) = 126,2 mg ; masse sèche (BRUULB-9) = 131,5 mg ; masse sèche (BRUULB-10) = 147,7 mg ; masse sèche (BRUULB-11) = 123,8 mg ; masse sèche (BRUULB-12) = 144 mg ; masse sèche (BRUULB-14) = 130,9 mg ; masse sèche (BRUULB-18) = 133,1 mg ; masse sèche (BRUULB-19) = 136,9 mg ; masse sèche (BRUULB-20) = 118 mg ; masse sèche (BRUULB-44) = 133,5 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Les profils spectraux des 16 individus de la collection BRUULB sont similaires même si des différences d'intensité peuvent être mises en évidence visuellement (BRUULB-4 et BRUULB-11 par exemple). Il en est de même avec les deux autres collections présentées en Annexes 13 et 14. Nous allons donc analyser les aires et les intensités spectrales mesurées dans chaque collection afin d'obtenir une comparaison plus fine entre ces individus.

2.2.2. Analyse des aires spectrales

Nous avons mesuré l'aire spectrale obtenue en RMN du proton de chaque individu des trois collections. Nous les avons représentées en fonction de l'âge au décès des sujets et de leur sexe dans la Figure 112 pour la collection BRUULB, dans la Figure 113 pour la collection MIL et dans la Figure 114 pour la collection IRCGN.

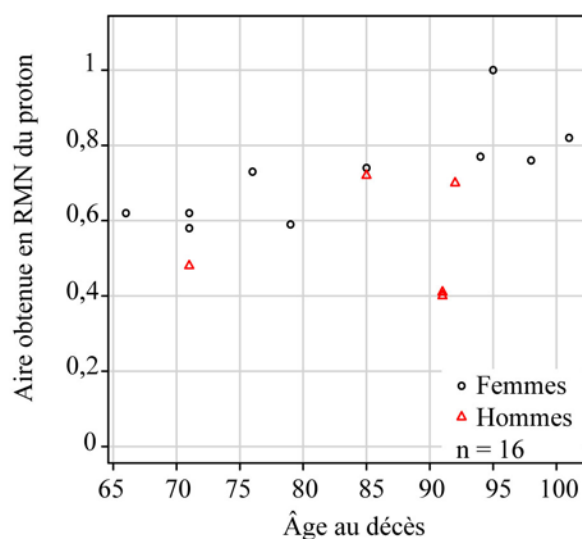


Figure 112 – Représentation graphique de l'aire obtenue en RMN du proton en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection BRUULB (n = 16)

L'intervalle de confiance de la mesure ($\pm 1,7\%$) est compris dans la taille du symbole.

Il semblerait que les aires obtenues en RMN du proton aient une légère tendance à augmenter avec l'âge au décès des individus. De même, les valeurs des aires des femmes sont supérieures à celles des hommes.

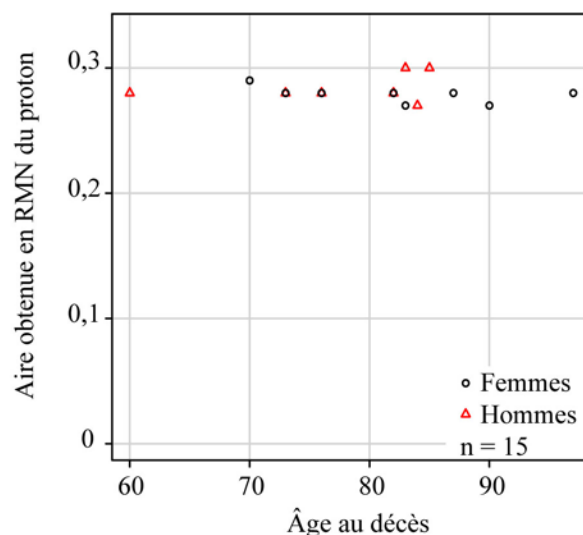


Figure 113 – Représentation graphique de l'aire obtenue en RMN du proton en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection MIL (n = 15)

L'intervalle de confiance de la mesure ($\pm 1,7\%$) est compris dans la taille du symbole.

Les valeurs des aires au sein de cette collection sont nettement inférieures à celles obtenues sur la collection BRUULB. On note cependant une grande variabilité ne permettant pas de tirer de conclusion.

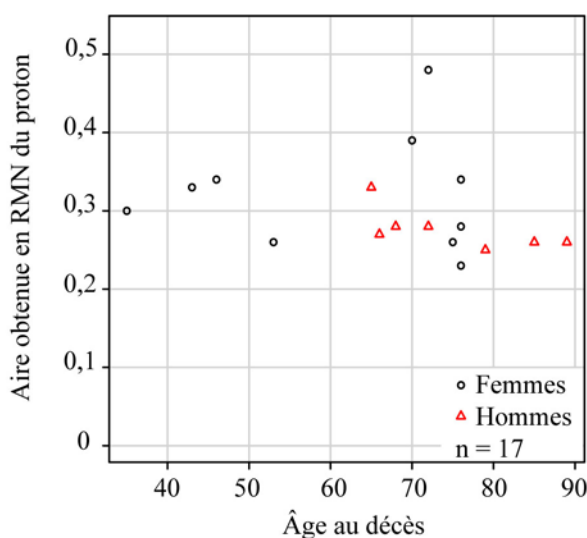


Figure 114 – Représentation graphique de l'aire obtenue en RMN du proton en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection IRCGN (n = 17)

L'intervalle de confiance de la mesure ($\pm 1,7\%$) est compris dans la taille du symbole.

Il en est de même au sein de cette collection où les valeurs apparaissent inférieures et encore plus dispersées.

Nous avons réalisé les mêmes tests statistiques qu'en RMN du carbone-13 afin de vérifier si les différences observées au niveau des graphiques étaient significatives. Les résultats sont présentés dans le Tableau 40.

Tableau 40 – Résultats des tests de Wilcoxon et de corrélation concernant l'aire obtenue en RMN du proton pour la collection BRUULB, et les sous échantillons des collections MIL et IRCGN

Collection								
BRUULB			MIL			IRCGN		
Test de Wilcoxon								
p	R ²		p	R ²		p	R ²	
	F	H		F	H		F	H
0,06	0,59	0,03	0,39	0,26	0,10	0,17	<0,01	0,49
Test de corrélation								
p	R ²		p	R ²		p	R ²	
0.12	0.17		0.73	0.11		0.44	0.04	

F : femmes ; H : hommes ; R² : coefficient de détermination ; les données brutes sont fournies en Annexe 10.

Les résultats ne sont pas significatifs ni avec le facteur âge au décès ni avec le facteur sexe. Les différences observées sur les graphiques ne sont donc pas dépendantes de ces facteurs et mettent juste en évidence une variabilité individuelle importante. Nous allons cependant voir si nous observons les mêmes résultats au niveau de l'intensité des pics.

2.2.3. Analyse des intensités spectrales

Tous les pics n'ont pas pu être individualisés chez tous les individus donc pour certaines valeurs de déplacements chimiques, certaines données sont manquantes indiquant que le pic est non distinct par rapport à l'ensemble des autres pics. Sa présence ne peut donc pas être quantifiée.

Nous avons étudié le comportement de deux pics distincts. D'une part, celui résonnant entre 1,20 et 1,43 ppm, attribuable aux groupes méthylène CH₂ des lipides ; et d'autre part, celui résonnant entre 0,10 et 0,20 ppm attribuable au groupe hydroxyle OH de l'hydroxyapatite. Les représentations graphiques de ces deux pics pour les collections BRUULB, MIL et IRCGN sont données dans la Figure 115, la Figure 116 et la Figure 117 respectivement.

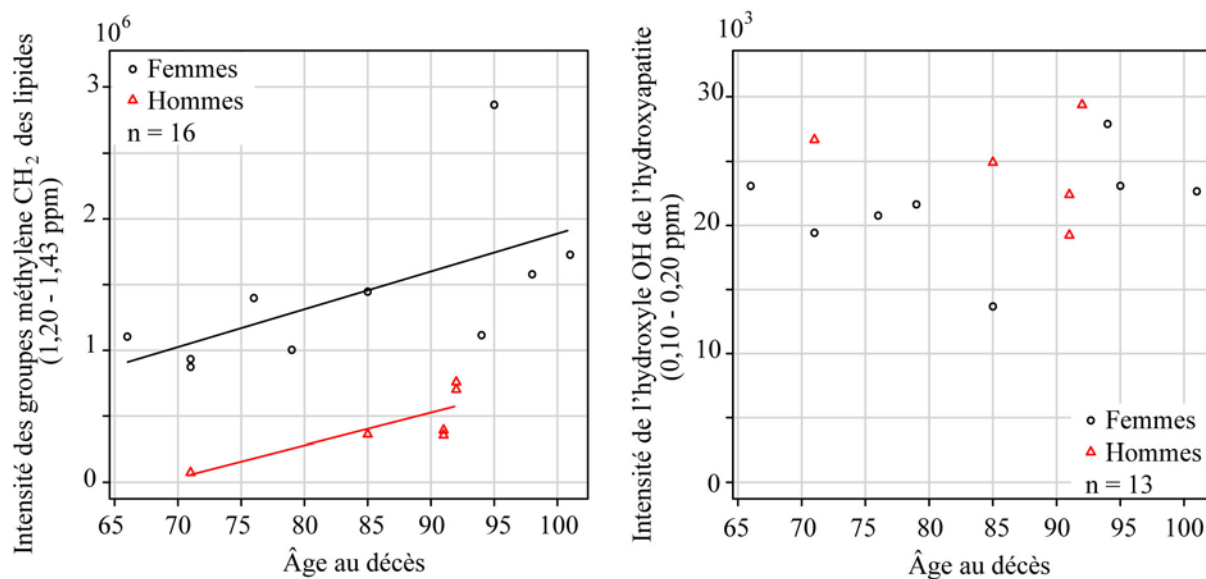


Figure 115 – Représentation graphique de l'intensité de 2 pics de résonance obtenue par RMN du proton en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection BRUULB ($n = 16$)

(a) pic résonnant entre 1,20 et 1,43 ppm attribuable aux groupes méthylène des lipides ; (b) pic résonnant entre 0,10 et 0,20 ppm attribuable au groupe hydroxyle de l'hydroxyapatite.
L'intervalle de confiance de la mesure ($\pm 1,7\%$) est compris dans la taille du symbole.

Dans la collection BRUULB, concernant l'intensité du pic attribuable aux groupes méthylène des lipides, nous constatons que son intensité semble augmenter avec l'âge et que les hommes présentent des valeurs inférieures à celles des femmes. Ce comportement ne se retrouve pas pour le pic relatif aux groupes hydroxyle de l'hydroxyapatite.

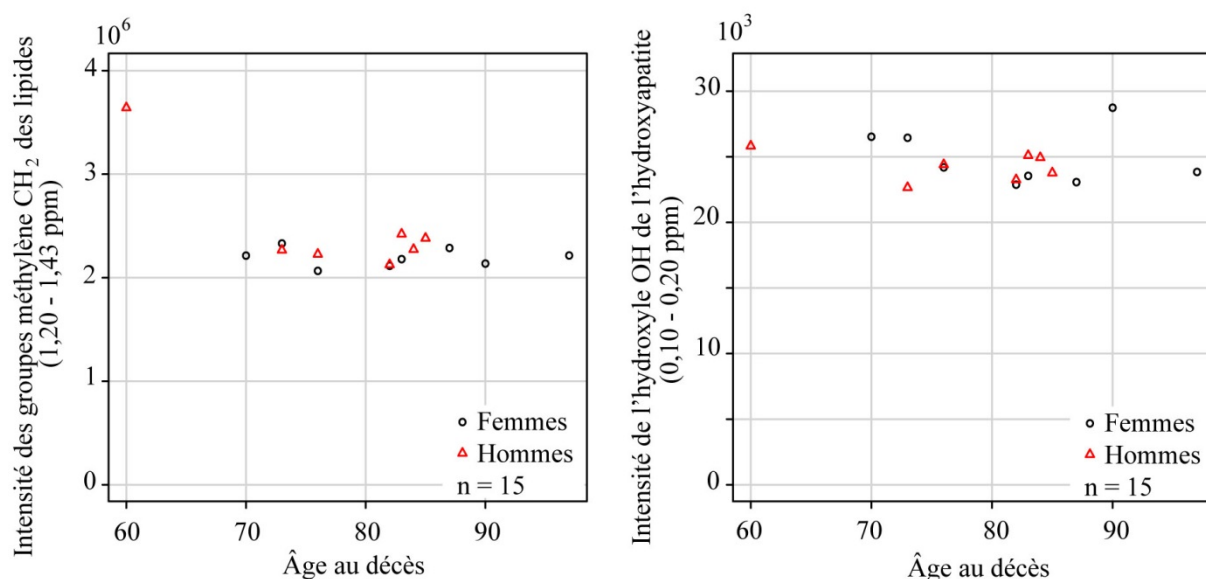


Figure 116 – Représentation graphique de l'intensité de 2 pics de résonance obtenue par RMN du proton en fonction de l'âge au décès et du sexe des individus de la collection MIL ($n = 15$)

(a) pic résonnant entre 1,20 et 1,43 ppm attribuable aux groupes méthylène des lipides ; (b) pic résonnant entre 0,10 et 0,20 ppm attribuable au groupe hydroxyle de l'hydroxyapatite.
L'intervalle de confiance de la mesure ($\pm 1,7\%$) est compris dans la taille du symbole.

Au sein de la collection MIL, nous n’observons pas de différence majeure quel que soit le pic considéré. Les valeurs semblent constantes indépendamment de l’âge au décès et du sexe des individus.

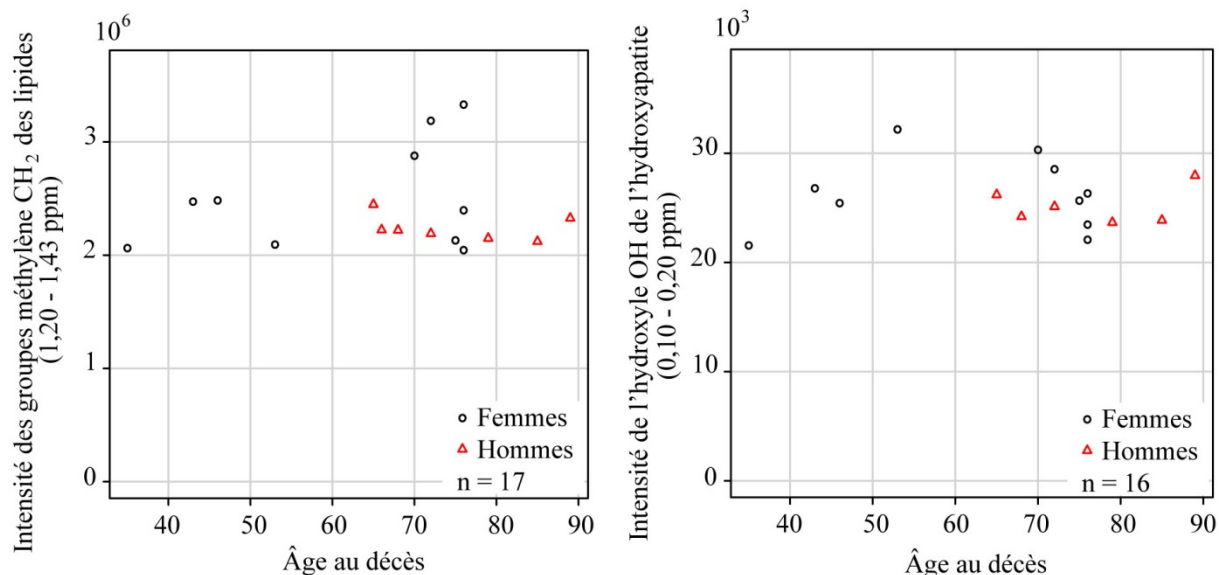


Figure 117 – Représentation graphique de l’intensité de 2 pics de résonance obtenue par RMN du proton en fonction de l’âge au décès et du sexe des individus de la collection IRCGN ($n = 17$)

(a) pic résonnant entre 1,20 et 1,43 ppm attribuable aux groupes méthylène des lipides ; (b) pic résonnant entre 0,10 et 0,20 ppm attribuable au groupe hydroxyle de l’hydroxyapatite.

L’intervalle de confiance de la mesure ($\pm 1,7\%$) est compris dans la taille du symbole.

Nous observons la même chose mais les valeurs présentent une plus grande variabilité.

Nous avons voulu vérifier ces observations à l’aide de tests statistiques. Les résultats des tests de Wilcoxon et de corrélation réalisés sur la collection BRUULB et les sous échantillons des collections MIL et IRCGN sont présentés dans le Tableau 41 et le Tableau 42.

Tableau 41 – Résultats du test de Wilcoxon concernant les intensités obtenues par RMN du proton pour la collection BRUULB, et les sous échantillons des collections MIL et IRCGN

Intensité		Collection								
		BRUULB			MIL			IRCGN		
		p	R ²		p	R ²		p	R ²	
Gamme de déplacements chimiques	Attribution		F	H		F	H		F	H
5,30 – 5,80	Lipides	0,01*	0,46	0,25		ND			ND	
4,10 – 4,35	Lipides	0,04*	0,47	0,24		ND			ND	
2,73 – 2,87	Lipides	0,06	0,18	0,30		ND			ND	
2,25 – 2,36	Lipides	0,00*	0,35	0,21		ND			ND	
1,93 – 2,13	Lipides	0,00*	0,42	0,52	0,04*	0,01	0,18	0,33		NC
1,55 – 1,70	Lipides	0,00*	0,37	0,23		ND			ND	
1,20 – 1,43	Lipides	0,00*	0,38	0,64	0,07	<0,01	0,67	0,70	0,14	0,10
0,82 – 0,94	Lipides	0,00*	0,41	0,56	0,05*	0,08	0,58	0,57	0,15	0,03
0,10 – 0,20	Hydroxyapatite	0,35	0,08	0,08	0,78	0,04	0,11	0,47	<0,01	0,04

ND : non détectable ; NC : non calculable (effectif trop faible) ; F : femmes ; H : hommes ; R² : coefficient de détermination ; p : *p*-valeur donnant la probabilité au seuil $\alpha = 5\%$; **p*** indique une *p*-valeur inférieure ou égale à 0,05 ; les données brutes sont fournies en Annexe 9.

Tableau 42 – Résultats du test de corrélation concernant les intensités obtenues par RMN du proton pour la collection BRUULB, et les sous échantillons des collections MIL et IRCGN

Intensité		Collection					
		BRUULB		MIL		IRCGN	
Gamme de déplacements chimiques	Attribution	p	R ²	p	R ²	p	R ²
5,30 – 5,80	Lipides	0,18	0,12		ND		ND
4,10 – 4,35	Lipides	0,27	0,09		ND		ND
2,73 – 2,87	Lipides	0,44	0,05		ND		ND
2,25 – 2,36	Lipides	0,52	0,03		ND		ND
1,93 – 2,13	Lipides	0,23	0,10	0,39	0,10	0,86	0,02
1,55 – 1,70	Lipides	0,54	0,03		ND		ND
1,20 – 1,43	Lipides	0,21	0,11	0,02*	0,36	0,70	0,01
0,82 – 0,94	Lipides	0,20	0,12	0,02*	0,35	0,59	0,02
0,10 – 0,20	Hydroxyapatite	0,62	0,02	0,57	0,03	0,94	<0,01

ND : non détectable ; R² : coefficient de détermination ; p : *p*-valeur donnant la probabilité au seuil $\alpha = 5\%$; **p*** indique une *p*-valeur inférieure ou égale à 0,05 ; Les données brutes sont fournies en Annexe 9.

Concernant la collection BRUULB, nous constatons que presque toutes les attributions lipidiques présentent des tests de Wilcoxon significatifs attestant de l'influence du sexe sur les intensités spectrales. Cependant, les tests de corrélation ne sont pas significatifs donc l'âge des individus n'influence que peu les valeurs.

Afin de visualiser cette différence d'intensité spectrale au sein de la collection BRUULB, nous avons réalisé un diagramme en barres de cette intensité dans l'échantillon total puis chez les femmes et chez les hommes (Figure 118).

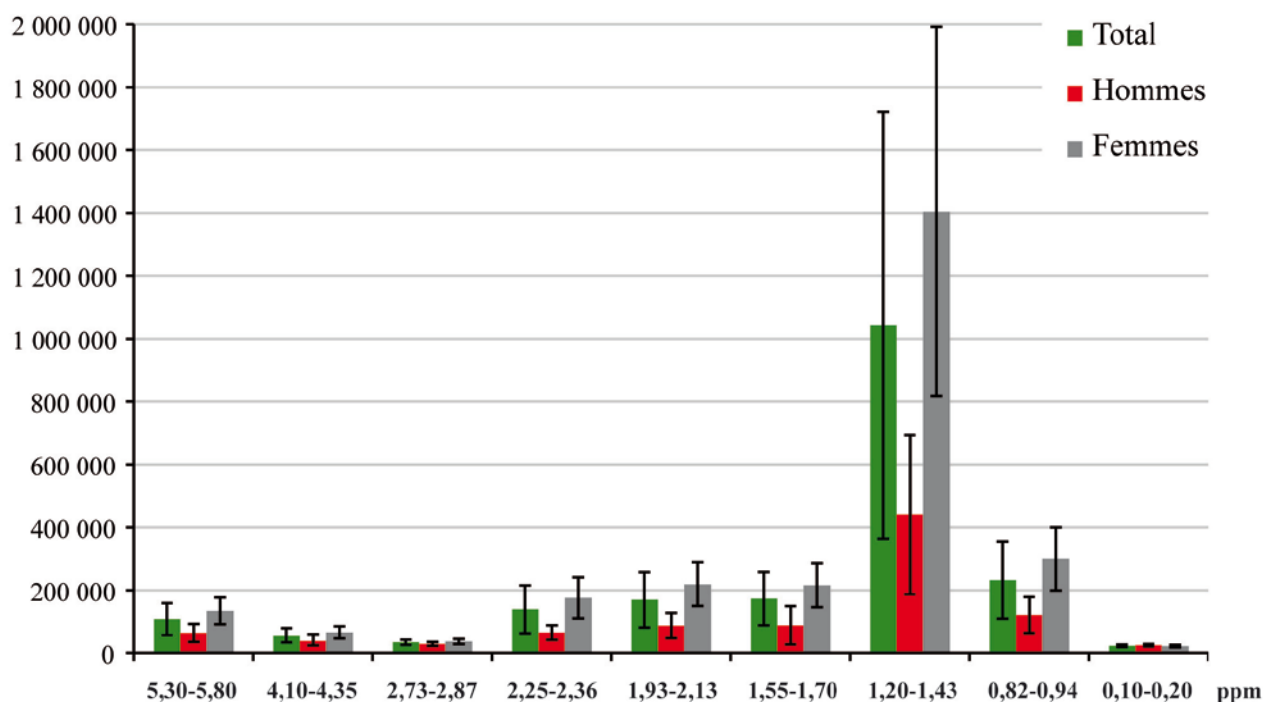


Figure 118 – Diagramme en barres représentant la moyenne de l'intensité spectrale (\pm écart-type) des pics identifiés en RMN du proton pour l'ensemble de la collection, pour les hommes et pour les femmes de la collection BRUULB

Pour tous les signaux lipidiques (pics situés entre 0,82 et 5,80 ppm) les femmes présentent une intensité spectrale nettement plus importante que les hommes.

Les mêmes tests menés sur les sous échantillons des collections MIL et IRCGN mettent en avant que seuls trois signaux lipidiques demeurent identifiables sur les 8 signaux initiaux (Tableau 41 et Tableau 42). Pour le sous échantillon de la collection MIL, une différence significative persiste quant à l'influence du sexe des individus sur l'intensité spectrale pour deux des trois attributions lipidiques (Tableau 41). Par ailleurs, deux pics sur trois présentent aussi une différence significative quant à l'influence de l'âge des individus (Tableau 42). Cependant les coefficients de détermination sont faibles donc la corrélation n'est pas forte. Concernant le sous échantillon de la collection IRCGN, aucun test n'est significatif.

Nous n'avons pas encore abordé les résultats des tests concernant le signal attribuable à l'hydroxyapatite (pic de résonance se situant entre 0,10 et 0,20 ppm). Il apparaît que, quelle que soit la collection, les tests de Wilcoxon et de corrélation ne sont pas significatifs (Tableau 41 et Tableau 42). Le sexe et l'âge des sujets n'interviennent donc pas dans les valeurs de cette intensité spectrale.

Sur les 29 variables mesurées (deux aires et 18 intensités spectrales en RMN du carbone-13 ; une aire et 9 intensités spectrales en RMN du proton), 13 présentent une dépendance au facteur

âge au décès et/ou sexe des sujets. Cependant, les coefficients de détermination associés sont faibles ce qui indique que la corrélation à l'un ou l'autre de ces facteurs est faible.

3. SYNTHÈSE ET DISCUSSION SUR LES VARIATIONS INTRA ET INTER-INDIVIDUELLES DES CONSTITUANTS DU TISSU OSSEUX

L'étude des variations intra-individuelles nous a permis de mettre en évidence une homogénéité entre les signaux obtenus pour deux os de même nature appartenant au même individu. Cette homogénéité corrobore l'uniformité de composition des os de même nature (Creamer et Buck 2009). En revanche, entre des os de nature différente du même individu, nous constatons que l'intensité du signal varie. Ainsi, les os longs des membres inférieurs (fémur et tibia) présentent des signaux sensiblement identiques en termes d'intensité et d'aire (Tableau 36 et Figure 95) avec, néanmoins, un signal légèrement supérieur pour les fémurs. En revanche, concernant les autres os (humérus, côte et vertèbre), nous remarquons une baisse des intensités et aires avec une diminution plus marquée pour les os courts (côte et vertèbres). Les signaux les plus forts sont donc retrouvés pour les fémurs, suivis des tibias, puis les humérus et enfin les vertèbres et côte. Ces variations sont à mettre en relation avec l'épaisseur de la corticale de ces os et donc à leur résistance face aux phénomènes diagénétiques (Grupe 1988). Nos résultats confirment que l'épaisseur de la corticale est un facteur important à prendre en compte pour toute évaluation qualitative des os (Mays 2000 ; Janjua et Rogers 2008 ; Creamer et Buck 2009).

Le ratio ALICO que nous avons déterminé pour identifier les altérations nous permet, ici aussi, de confirmer ces résultats. En effet, pour l'individu MV-13, trois os sortent de l'intervalle de confiance et ont un ratio diminué ce qui indique que le signal provenant de la chaîne aliphatique des acides aminés de ces échantillons est réduit. Ces os sont tous des vertèbres, ce qui confirme ainsi nos premières conclusions. Nous pouvons toutefois noter que les humérus et la côte analysés pour les individus Sorbey-1 et MV-13 (échantillons Sorbey-1-3 ; Sorbey-1-5 ; MV-13-5) ne sortent pas de l'intervalle de confiance que nous avons défini. Ces os ont donc un signal quantitativement moins important mais qualitativement conservé.

Nous avons donc choisi de réaliser nos prélèvements au sein de la diaphyse et non pas au niveau des extrémités qui présentent beaucoup de tissu spongieux ; et de focaliser nos analyses sur les fémurs qui sont les os présentant une susceptibilité à l'altération et à la dégradation la plus faible, et, de plus, ce sont des os qui sont fréquemment retrouvés en contextes médico-légaux (Mays 2000 ; Forbes 2004 ; Introna *et al.* 1999).

Nous avons ensuite réalisé nos analyses sur des os appartenant à des individus différents pour lesquels les dates de décès étaient contemporaines et pour lesquels nous connaissions le sexe et l'âge au décès. Cela a représenté 48 individus issus de trois sous collections (BRUULB,

collection la plus récente datée de 2011 et 2012 ; MIL, collection datée de 1991 et 1992 ; et IRCGN, collection la plus ancienne dont les date de décès sont comprises entre 1936 et 1942).

Un résultat intéressant est que le sexe n'influence pas les aires et intensités mesurées sur nos trois sous échantillons en RMN du carbone-13. Comme les analyses du carbone-13 permettent essentiellement d'étudier le collagène et ses acides aminés, ces résultats indiquent que le sexe n'influence pas qualitativement la composition osseuse du collagène.

En revanche, le sexe influence les intensités spectrales obtenues en RMN du proton sur les individus récents. Sur les collections plus anciennes, l'âge au décès et le sexe ne sont pas des paramètres influant les intensités et les aires mesurées en RMN du proton.

Chapitre 5.4

Influence de l'intervalle *post mortem* et des conditions de conservation sur les constituants du tissu osseux

Nous venons de voir que les facteurs âge et sexe n'avaient pas une influence importante sur les constituants du tissu osseux analysés par RMN, exception faite des os très récents ou « frais » pour lesquels des différences quantitatives en fonction du sexe des sujets existent. Nous allons maintenant aborder la question de l'influence du délai *post mortem* et des conditions de conservation sur les constituants du tissu osseux. De par la nature hétérogène de notre collection, ces deux paramètres sont étroitement liés. En effet, certaines collections présentent des conditions de conservation unique pour un même délai *post mortem* (par exemple les collections de l'Université Libre de Bruxelles et de Milan) ; d'autres présentent une même condition de conservation mais des délais *post mortem* différents (par exemple la collection du Muséum National de Prague) ; et enfin, certaines collections présentent des conditions de conservation ainsi que des délais *post mortem* différents (par exemple la collection de l'IRCGN).

1. INFLUENCE DE L'INTERVALLE *POST MORTEM*

1.1. SUR NOTRE COLLECTION GLOBALE

Notre collection initiale comprend 98 individus dont 12 se sont révélés altérés par une transformation adipocireuse comme le rapport que nous avons déterminé (ALICO) a permis de l'identifier (Figure 84 page 220). Les délais *post mortem* de notre collection globale sont compris entre 0 et 6 000 ans ; cependant, les sujets ne se répartissent pas uniformément au cours de ce grand intervalle de temps. Nous allons étudier l'influence de l'intervalle *post mortem* sur les individus humains de notre population globale pour lesquels nous disposons des fémurs⁶⁹ (Tableau 43), puisqu'il s'agit de l'os qui présente le meilleur signal RMN.

⁶⁹ Seul l'individu SSPM3 n'a pas été retenu pour cette étude car nous ne disposons pas d'échantillon de fémur mais d'un échantillon de mandibule.

Tableau 43 – Effectifs des individus de notre collection globale pour lesquels nous disposons des fémurs par classe d'intervalle post mortem

Classes d'intervalle <i>post mortem</i> (ans)	Effectif (n)	Individus
[0-1]	21	- Collection École de chirurgie (n = 4) ; - BRUULB (n = 16) ; - MIL-L1F
[2-10]	8	- PRG717/2003 ; PRG1116/2004 ; PRG827/2004 ; PRG518/2005 ; PRG567/2010 ; PRG1021/2010 ; - IRCGNc-#6/2003 ; IRCGNc-#2/2003
[11-50]	30	- MV-6-1 ; - PRG/91 ; PRG242/93 ; PRG343/94 ; PRG342/94 ; PRG596/95 ; PRG709/2001 ; - IRCGN-01 ; IRCGN-02 ; IRCGN-03 ; IRCGN-38 ; IRCGNc-#3/2002 ; IRCGNc-#4/2002 ; IRCGNc-#9/2002 ; - BRUCHAT-4 ; - Collection Milan (n = 15)
[50-100]	31	- Collection Simon (n = 5) ; - Sorbey-1-1 ; MV-5 ; MV-13-1 ; - IRCGN-06 ; IRCGN-15 à IRCGN-36 (n = 19) ; - BRUCHAT-2 ; BRUCHAT-13 ; BRUMANAGE
[100-300]	3	- IRCGN-07 ; IRCGN-08 ; - SB3
> 300	4	- IRCGN-12 ; IRCGN-14 ; IRCGN-37 ; - LYON-03
n = 97		

Par souci de concision, dans un premier temps, nous allons seulement comparer les spectres obtenus en RMN du carbone-13 de 9 individus présentant des délais *post mortem* différents. Puis nous interpréterons ces résultats en fonction des aires et intensités obtenues sur la population globale. Dans un second temps, nous réaliserons la même approche sur les 9 mêmes individus avec l'analyse des spectres en RMN du proton.

1.1.1. Analyse en RMN du carbone-13

Les spectres RMN du carbone-13 de 9 individus issus de la collection globale sont présentés dans la Figure 119. Ils nous fournissent des informations essentiellement sur la conservation et la dégradation de la matière organique contenue dans l'os (collagène de type I et ses acides aminés).

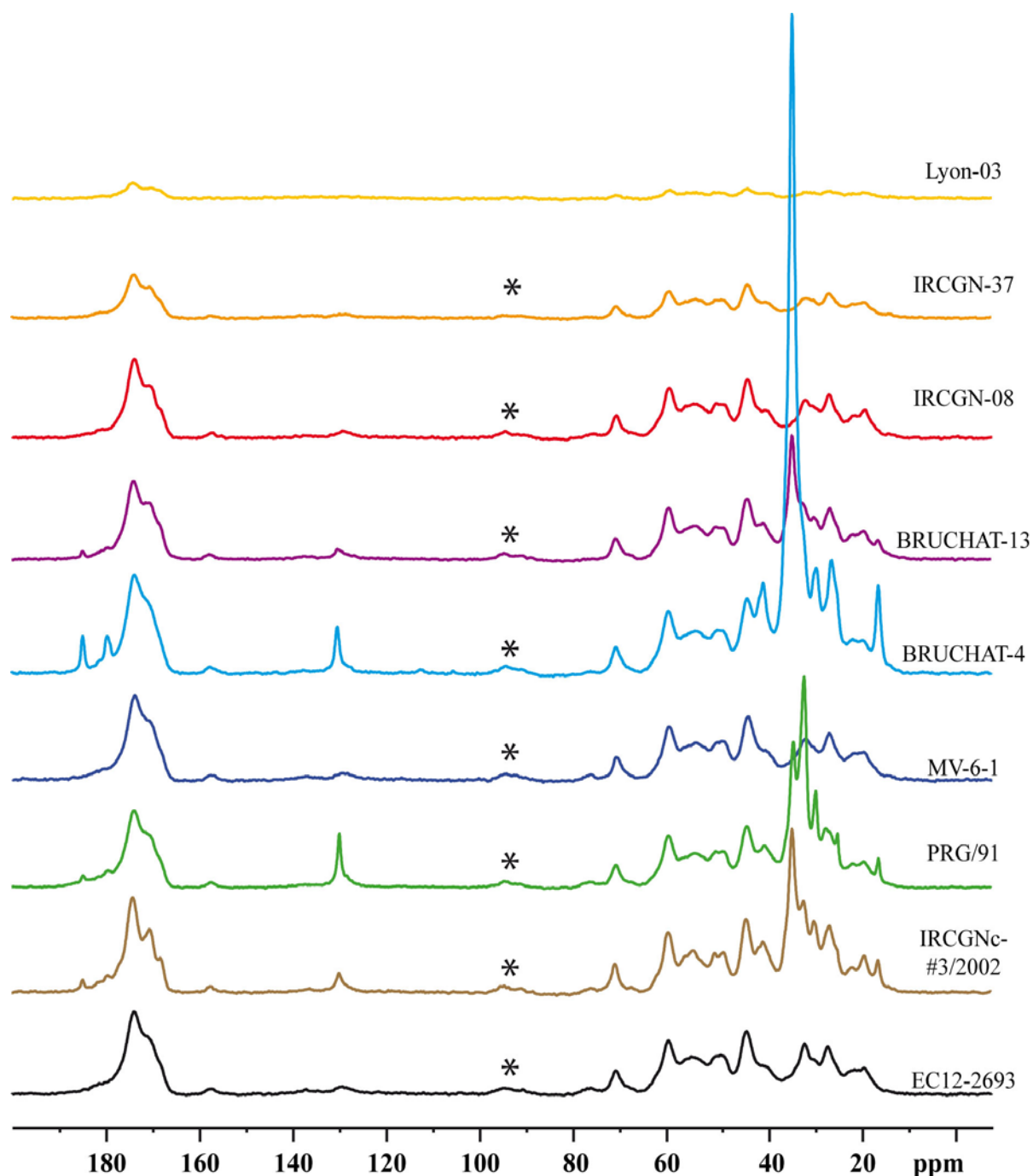


Figure 119 – Spectres RMN du carbone-13 des fémurs de 9 individus appartenant à la collection globale présentant des délais *post mortem* compris entre 0 et 2000 ans

* : bande de rotation.

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg.

EC12-2693 (IPM = 0 an) ; IRCGNc-#3/2002 (IPM = 10 ans) ; PRG/91 (IPM = 22 ans) ; MV-6-1 (IPM = 32 ans) ; BRUCHAT-4 (IPM = 50 ans) ; BRUCHAT-13 (IPM = 71 ans) ; IRCGN-08 (IPM ≈ 140 ans) ; IRCGN-37 (IPM ≈ 400 ans) ; LYON-03 (IPM ≈ 2 000 ans).

Masse initiale (EC12-2693) = 128,2 mg ; masse initiale (IRCGNc-#3/2002) = 135,3 mg ; masse initiale (PRG/91) = 148,2 mg ; masse initiale (MV-6-1) = 112,3 mg ; masse initiale (BRUCHAT-4) = 131,8 mg ; masse initiale (BRUCHAT-13) = 151,1 mg ; masse initiale (IRCGN-08) = 116,7 mg ; masse initiale (IRCGN-37) = 139,2 mg ; masse initiale (LYON-03) = 134,7 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Nous constatons que les profils spectraux sont très différents entre ces 9 individus. Ainsi, l'individu le plus récent, EC12-2693, n'est pas celui qui présente une intensité spectrale maximale comme nous aurions pu nous y attendre. Afin de visualiser plus précisément ces différences, nous avons superposé les spectres entre eux (Figure 120).

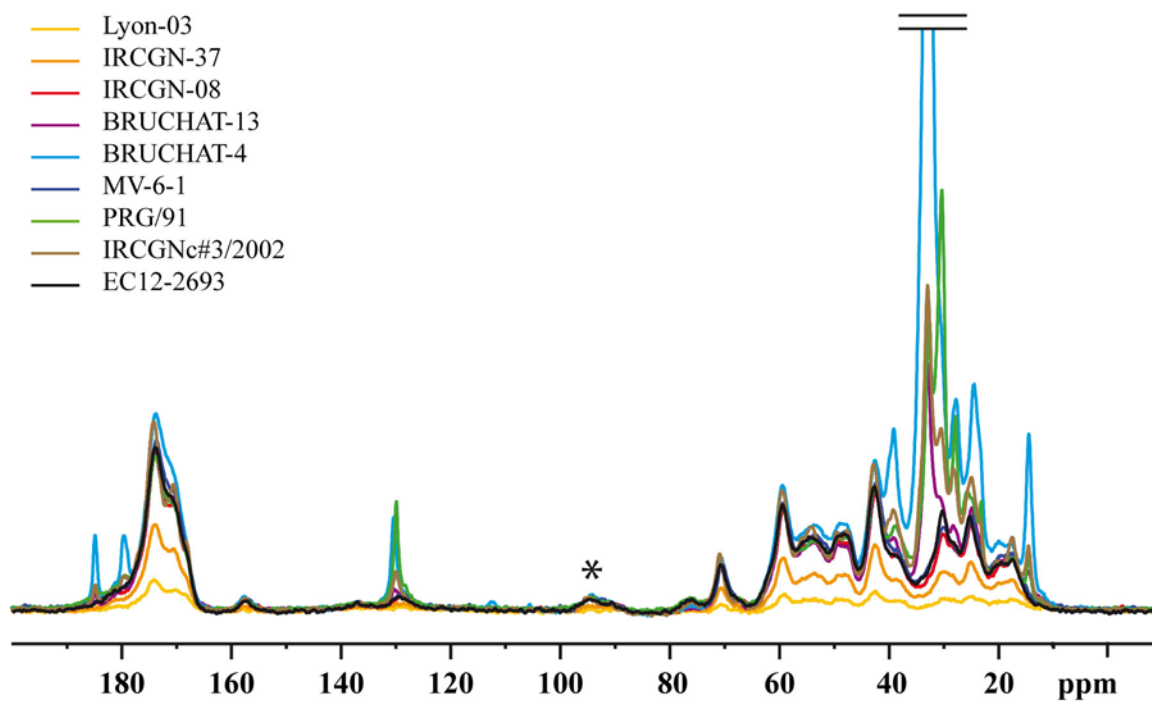


Figure 120 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 des fémurs de 9 individus appartenant à la collection globale présentant des délais *post mortem* compris entre 0 et 2000 ans

* : bande de rotation ; = : section du spectre de BRUCHAT-4 afin d'aider à la visualisation.

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg.

EC12-2693 (IPM = 0 an) ; IRCGNc-#3/2002 (IPM = 10 ans) ; PRG/91 (IPM = 22 ans) ; MV-6-1 (IPM = 32 ans) ; BRUCHAT-4 (IPM = 50 ans) ; BRUCHAT-13 (IPM = 71 ans) ; IRCGN-08 (IPM ≈ 140 ans) ; IRCGN-37 (IPM ≈ 400 ans) ; LYON-03 (IPM ≈ 2 000 ans).

Masse initiale (EC12-2693) = 128,2 mg ; masse initiale (IRCGNc-#3/2002) = 135,3 mg ; masse initiale (PRG/91) = 148,2 mg ; masse initiale (MV-6-1) = 112,3 mg ; masse initiale (BRUCHAT-4) = 131,8 mg ; masse initiale (BRUCHAT-13) = 151,1 mg ; masse initiale (IRCGN-08) = 116,7 mg ; masse initiale (IRCGN-37) = 139,2 mg ; masse initiale (LYON-03) = 134,7 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

La superposition des spectres confirme que ceux-ci présentent des profils très hétérogènes. Nous pouvons ainsi noter que, comparé aux autres sujets, l'individu BRUCHAT-4 présente un pic vers 33 ppm très intense ainsi que des pics supplémentaires notamment dans la zone de déplacements chimiques des groupes carboxyle (vers 170-185 ppm) ; de même, IRCGNc-#3/2002 ou PRG/91 présente ces mêmes modifications spectrales mais dans une moindre mesure. Afin de déterminer si ces différences sont liées au délai *post mortem*, nous allons étudier plus particulièrement les aires et les intensités de tous les échantillons de cette population globale.

1.1.1.1. Variation des aires spectrales

Les aires spectrales nous apportent des informations globales sur notre échantillon mais sont peu spécifiques d'un constituant en particulier. Nous avons représenté dans la Figure 121 l'évolution des aires des chaînes aliphatiques et dans la Figure 122 celle des groupes carboxyles en fonction de l'intervalle *post mortem* pour l'ensemble de notre collection. Les aires spectrales sont re-normalisées à 100 pour plus de lisibilité. La valeur 100 est attribuée à l'aire la plus importante.

Il apparaît que les aires spectrales diminuent avec l'ancienneté du décès et ceci de façon synchrone pour les groupes carboxyle et les chaînes aliphatiques. Cette variation ressemble à une décroissance exponentielle en considérant l'intervalle 0 – 6 000 ans. Un tracé en mode logarithme (non montré) suggère qu'il y aurait deux décroissances exponentielles, l'une aux temps courts et l'autre aux temps longs. Une tentative de paramétrage de ces décroissances a été réalisée en considérant une somme de deux exponentielles décroissantes, une sur les temps courts, caractérisée par une constante de temps T_S et une sur les temps longs de constante de temps T_L selon une formule de type :

[13]

avec $A(IPM)$ l'aire (ou intensité) spectrale en fonction de l'intervalle *post mortem* ; A_1 et A_2 les pré-facteurs donnant les proportions des deux fonctions ; IPM l'intervalle *post mortem* en années ; T_S la constante aux temps courts en années ; et T_L la constante aux temps longs en années. Comme les données sont très dispersées, surtout aux temps courts, un ajustement automatique est impossible. L'ajustement se fait en considérant au mieux l'allure générale de la courbe de paramétrage vis à vis de la variation expérimentale.

Pour les aires des chaînes aliphatiques, les valeurs de ces paramètres permettant la meilleure approximation sont les suivantes : $A_1 = 40 \pm 5$; $A_2 = 10 \pm 5$; $T_S = 400 \pm 100$ ans et $T_L = 7\,000 \pm 1\,000$ ans. La représentation graphique des aires et la courbe ajustée pour les chaînes aliphatiques sont présentées dans Figure 121. L'ajustement paraît globalement convenable, cependant nous constatons qu'il y a des points qui s'écartent très nettement de la simulation (BRUCHAT-4 par exemple qui présente la valeur la plus forte c'est-à-dire 100).

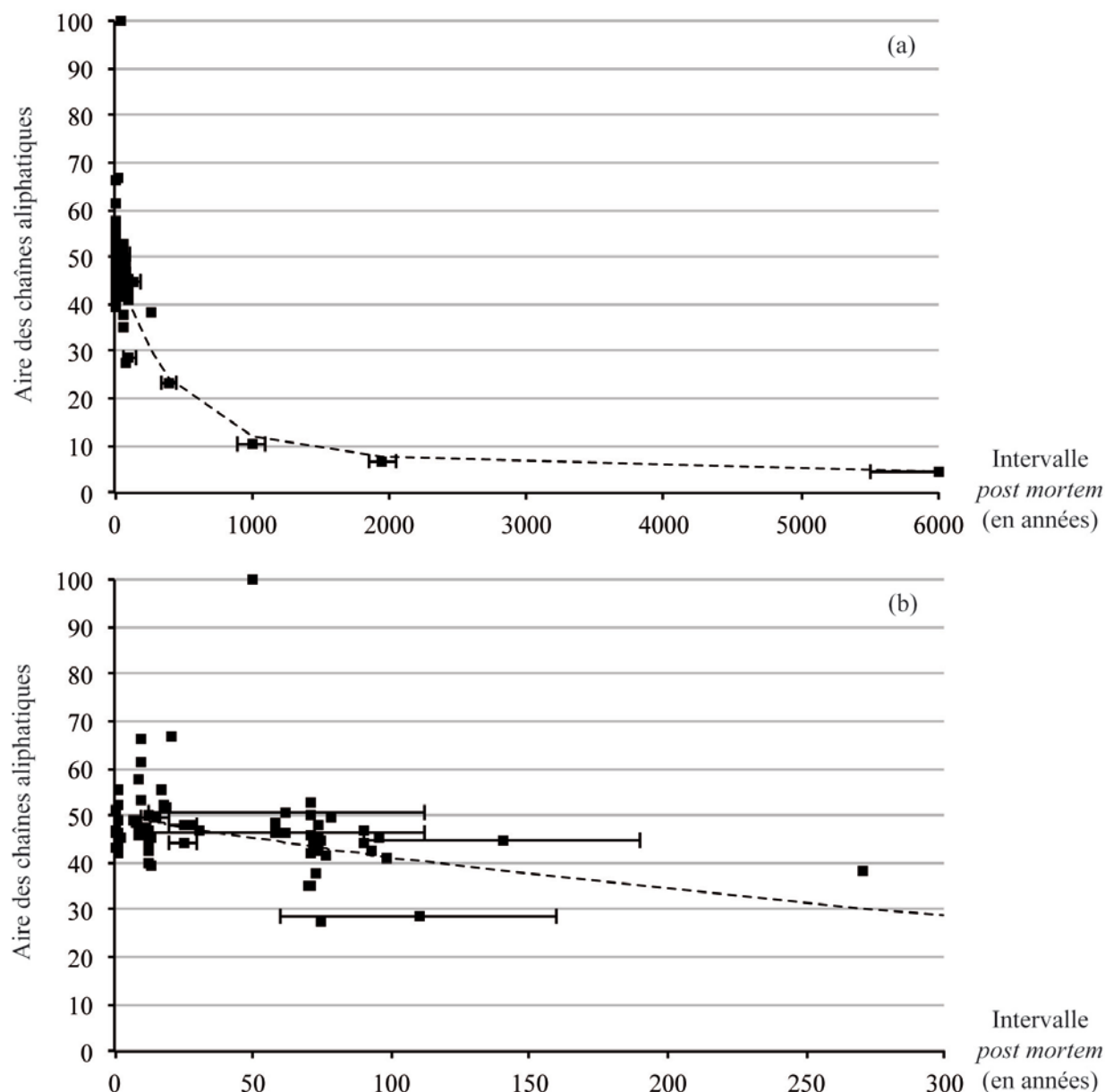


Figure 121 – Représentation graphique de l'aire des chaînes aliphatiques des individus de la collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle *post mortem*

(a) pour tous les individus de la collection (n = 97) ; (b) pour les individus dont l'intervalle *post mortem* est inférieur à 300 ans (n = 93) ; --- : courbe ajustée selon l'équation bi-exponentielle [13].

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 6 ; la barre d'erreur verticale représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$ est contenue dans le symbole ; la barre d'erreur horizontale représente l'intervalle de confiance de l'estimation du délai *post mortem* lorsque la date de décès de l'individu n'est pas connue avec précision.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'ajustement : $A_1 = 40 \pm 5$; $A_2 = 10 \pm 5$; $T_S = 400 \pm 100$ ans et $T_L = 7000 \pm 1\,000$ ans.

Pour les groupes carboxyle, la même analyse a été conduite. Nous constatons des variations plus homogènes avec moins de points manifestement en dehors de la variation globale. Le paramétrage donne des valeurs qui changent légèrement : $A_1 = 70 \pm 5$; $A_2 = 20 \pm 5$;

$T_S = 400 \pm 100$ ans et $T_L = 10\,000 \pm 1\,000$ ans. La représentation graphique des aires et la courbe ajustée pour les groupes carboxyle est présentée dans Figure 122.

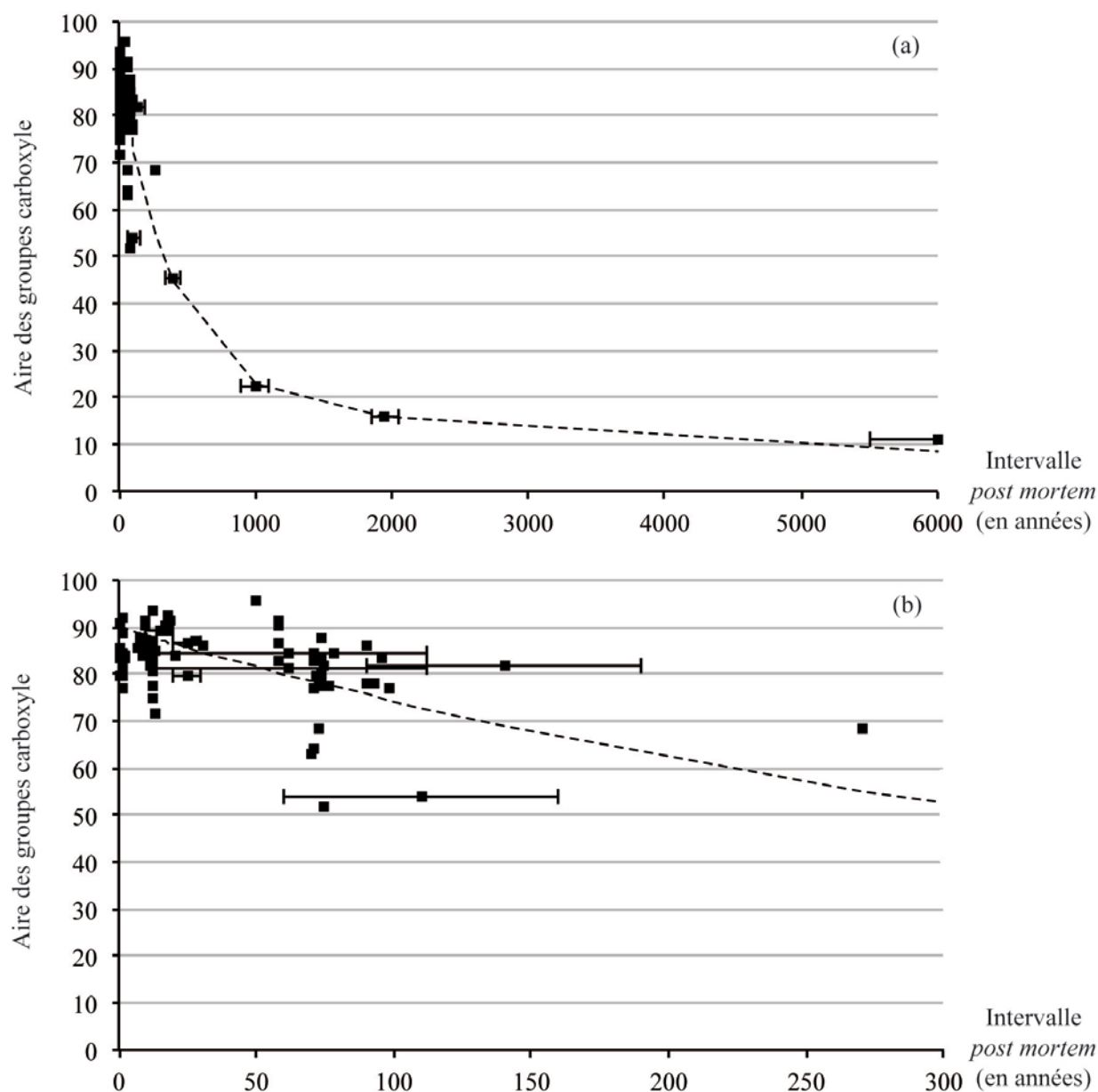


Figure 122 – Représentation graphique de l'aire des groupes carboxyle des individus de la collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle *post mortem*

(a) pour tous les individus de la collection ($n = 97$) ; (b) pour les individus dont l'intervalle *post mortem* est inférieur à 300 ans ($n = 93$) ; --- : courbe ajustée selon l'équation bi-exponentielle [13].

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 6 ; la barre d'erreur verticale représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$ est contenue dans le symbole ; la barre d'erreur horizontale représente l'intervalle de confiance de l'estimation du délai *post mortem* lorsque la date de décès de l'individu n'est pas connue avec précision.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'ajustement : $A_1 = 70 \pm 5$; $A_2 = 20 \pm 5$; $T_S = 400 \pm 100$ ans et $T_L = 10\,000 \pm 1\,000$ ans.

La tendance à la diminution des aires spectrales semble s'initier dès les premières années qui suivent le décès. Dans les premières centaines d'années, la décroissance est relativement linéaire puis elle ralentit d'où l'utilisation d'une fonction bi-exponentielle pour expliquer son évolution.

Face à cette décroissance des aires des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle, nous avons voulu savoir si ce comportement était aussi retrouvé au sein de chaque pic composant le spectre et nous avons alors étudié les intensités spectrales.

1.1.1.2. Variation des intensités spectrales

Afin de vérifier si la diminution de l'aire spectrale en fonction du temps concerne tous les constituants du tissu osseux et donc affecte de manière homogène l'ensemble des pics des spectres, nous avons observé le comportement de trois pic pris individuellement en fonction de l'intervalle *post mortem*. Nous avons choisi :

- Le pic de résonance de la glycine (42,7 – 43,3 ppm) : la glycine est l'acide aminé le plus abondant dans le collagène de type I où il représente un acide aminé sur trois (Figure 123) ;
- Le pic de résonance du C β de la proline, du C β de l'arginine et des groupes méthylène CH₂ des chaînes aliphatiques des lipides (29,1 – 30,5 ppm) : ce pic est très informatif puisqu'il permet d'étudier les fractions collagénique et lipidique de la matière organique (Figure 124) ;
- Le pic de résonance le plus intense attribuable aux groupes carboxyle (vers 173 ppm) (Figure 125).

La décroissance de l'intensité du signal avec le temps suit le même schéma bi-exponentiel que celui observé sur les aires spectrales. Nous pouvons donc appliquer les ajustements des paramètres de l'équation [13] pour chacun des pics étudiés. Les paramètres retenus sont fournis dans les légendes des figures concernées.

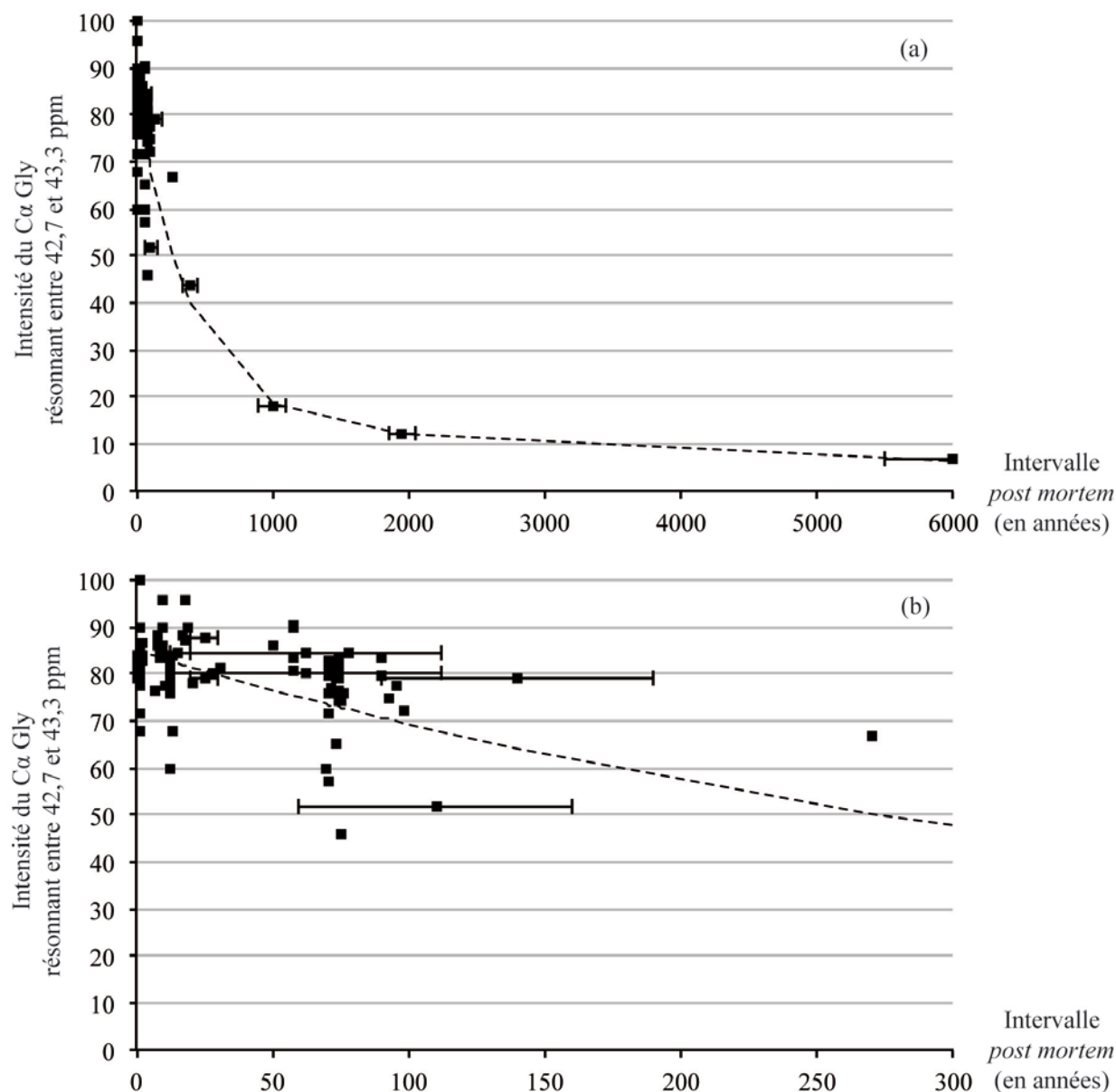


Figure 123 – Représentation graphique de l'intensité du Ca de la glycine (résonnant entre 42,7 et 43,3 ppm) des individus de notre collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle *post mortem*

(a) pour tous les individus de la collection ($n = 97$) ; (b) pour les individus dont l'intervalle *post mortem* est inférieur à 300 ans ($n = 93$) ; --- : courbe ajustée selon l'équation bi-exponentielle [13].

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 6 ; la barre d'erreur verticale représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$ est contenue dans le symbole ; la barre d'erreur horizontale représente l'intervalle de confiance de l'estimation du délai *post mortem* lorsque la date de décès de l'individu n'est pas connue avec précision.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'ajustement : $A_1 = 70 \pm 5$; $A_2 = 15 \pm 5$; $T_S = 400 \pm 100$ ans et $T_L = 7\,000 \pm 1\,000$ ans.

Le pic relatif au Ca de la glycine voit son intensité diminuer avec l'augmentation de l'intervalle *post mortem*. Nous observons une dispersion assez importante de ce pic pour les individus avec les délais *post mortem* les plus courts.

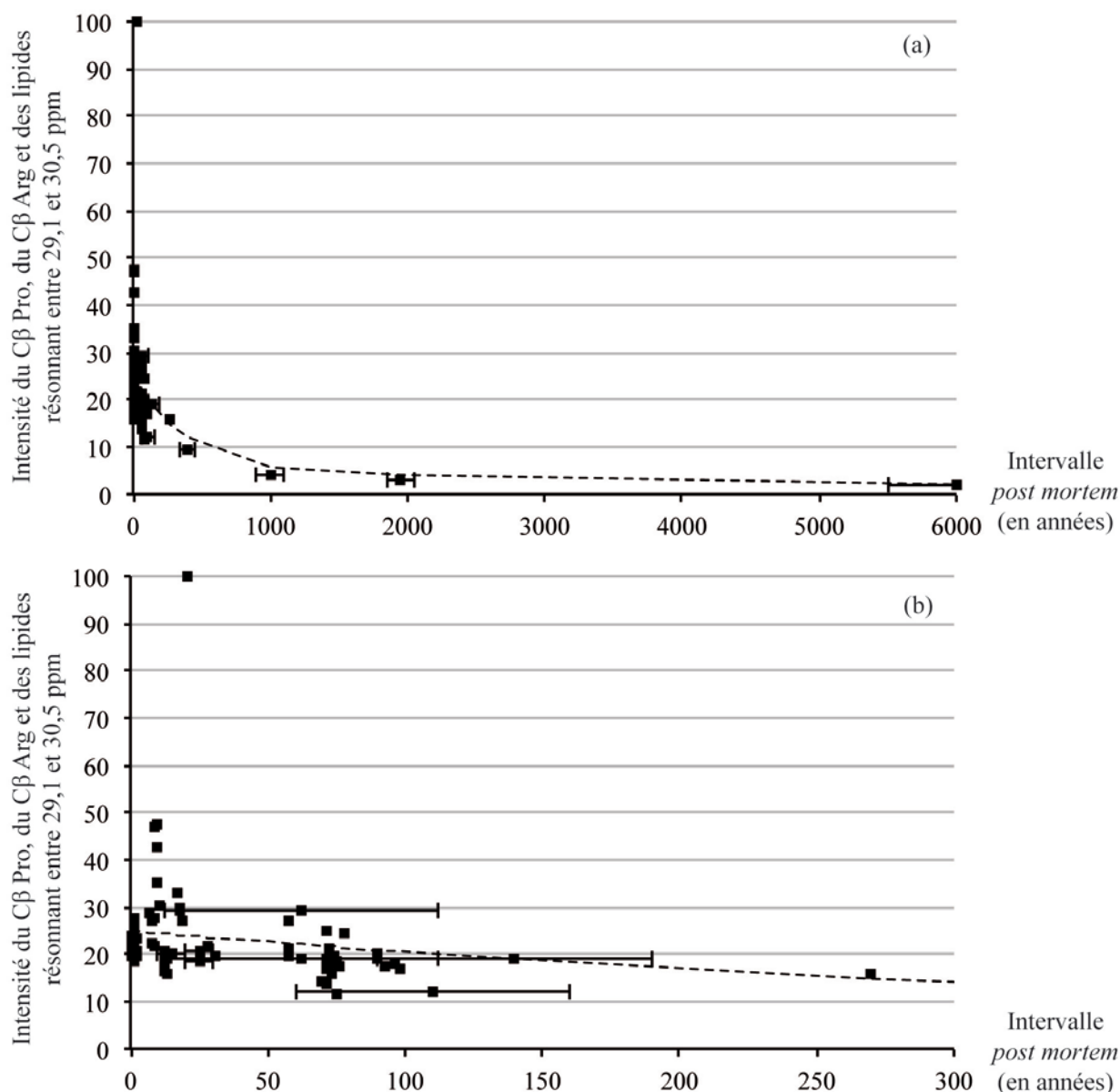


Figure 124 – Représentation graphique de l'intensité du C β de la proline, du C β de l'arginine et des groupes méthylène CH₂ des lipides (résonnant entre 29,1 et 30,5 ppm) des individus de notre collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle *post mortem*

(a) pour tous les individus de la collection pour lesquels ce pic est mesurable ($n = 95$) ; (b) pour les individus de la collection pour lesquels ce pic est mesurable et dont l'intervalle *post mortem* est inférieur à 300 ans ($n = 91$) ; --- : courbe ajustée selon l'équation bi-exponentielle [13].

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 6 ; la barre d'erreur verticale représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$ est contenue dans le symbole ; la barre d'erreur horizontale représente l'intervalle de confiance de l'estimation du délai *post mortem* lorsque la date de décès de l'individu n'est pas connue avec précision.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'ajustement : $A_1 = 20 \pm 5$; $A_2 = 5 \pm 1$; $T_S = 400 \pm 100$ ans et $T_L = 7\,000 \pm 1\,000$ ans.

Le comportement observé au niveau de la glycine s'observe aussi sur ce pic attribuable au C β de la proline, au C β de l'arginine et aux groupes méthylène des lipides. Les valeurs apparaissent moins dispersées malgré la présence d'un individu (PRG596/95) ayant une intensité très forte pour ce pic.

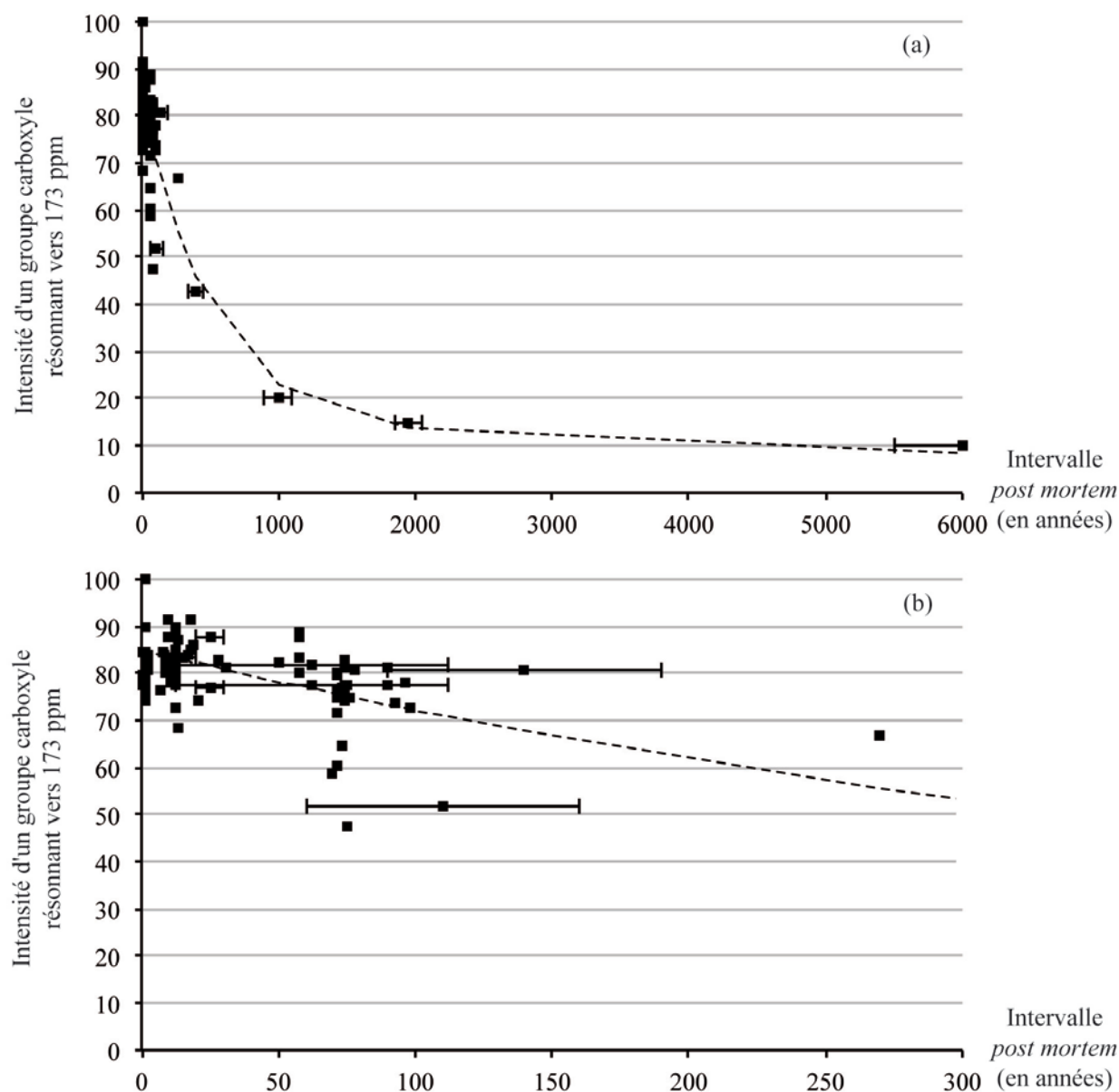


Figure 125 – Représentation graphique de l'intensité du pic le plus intense des groupes carboxyle (résonnant vers 173 ppm) des individus de notre collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle *post mortem*

(a) pour tous les individus de la collection ($n = 97$) ; (b) pour les individus dont l'intervalle *post mortem* est inférieur à 300 ans ($n = 93$) ; --- : courbe ajustée selon l'équation bi-exponentielle [13].

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 6 ; la barre d'erreur verticale représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$ est contenue dans le symbole ; la barre d'erreur horizontale représente l'intervalle de confiance de l'estimation du délai *post mortem* lorsque la date de décès de l'individu n'est pas connue avec précision.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'ajustement : $A_1 = 70 \pm 5$; $A_2 = 15 \pm 5$; $T_S = 500 \pm 100$ ans et $T_L = 10\,000 \pm 1\,000$ ans.

Ce pic appartenant à un groupe carboxyle se comporte comme les deux pics précédents. Nous notons une décroissance de son intensité avec le temps. Sur les trois intensités spectrales analysées en carbone-13 que nous venons de voir, il apparaît que c'est celle qui présente les valeurs les moins variables.

Que ce soit pour les aires ou les intensités spectrales, nous obtenons des constantes de temps aux temps courts et aux temps longs sensiblement similaires (400-500 ans et 7 000-10 000 ans respectivement). Les acides aminés contenus dans le collagène possèdent donc un comportement identique aux temps longs et aux temps courts.

1.1.2. Analyse en RMN du proton

Comme nous l'avons vu dans le chapitre sur l'attribution des spectres proton, ceux-ci nous apportent des informations complémentaires à celles obtenues sur les spectres RMN du carbone-13 notamment sur les lipides contenus dans le tissu osseux mais aussi sur la matière minérale, l'hydroxyapatite. Nous avons comparé les spectres RMN du proton des mêmes 9 individus que nous avons étudiés en RMN du carbone-13 et les spectres sont fournis dans la Figure 126.

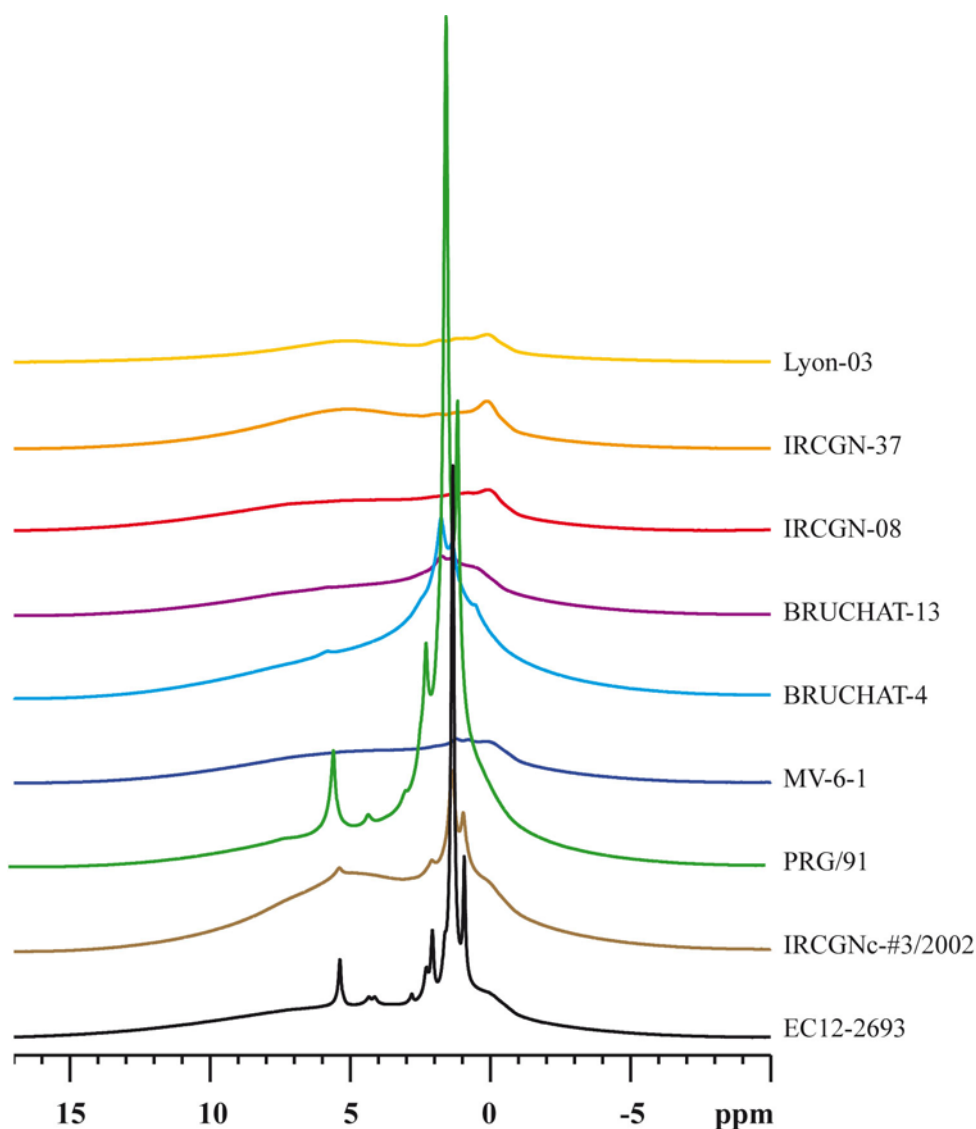


Figure 126 – Spectres RMN du proton des fémurs de 9 individus appartenant à la collection globale présentant des délais *post mortem* compris entre 0 et 2000 ans

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg.

EC12-2693 (IPM = 0 an) ; IRCGNc-#3/2002 (IPM = 10 ans) ; PRG/91 (IPM = 22 ans) ; MV-6-1 (IPM = 32 ans) ; BRUCHAT-4 (IPM = 50 ans) ; BRUCHAT-13 (IPM = 71 ans) ; IRCGN-08 (IPM ≈ 140 ans) ; IRCGN-37 (IPM ≈ 400 ans) ; LYON-03 (IPM ≈ 2 000 ans).

Masse sèche (EC12-2693) = 123,6 mg ; masse sèche (IRCGNc-#3/2002) = 128,3 mg ; masse sèche (PRG/91) = 118,6 mg ; masse sèche (MV-6-1) = 110,4 mg ; masse sèche (BRUCHAT-4) = 108,0 mg ; masse sèche (BRUCHAT-13) = 139,9 mg ; masse sèche (IRCGN-08) = 118,9 mg ; masse sèche (IRCGN-37) = 134,3 mg ; masse sèche (LYON-03) = 126,2 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Ici aussi, comme pour les spectres RMN du carbone-13, nous constatons de grandes variations entre les échantillons. Nous avons superposé les spectres afin de rendre plus aisée leur comparaison (Figure 127).

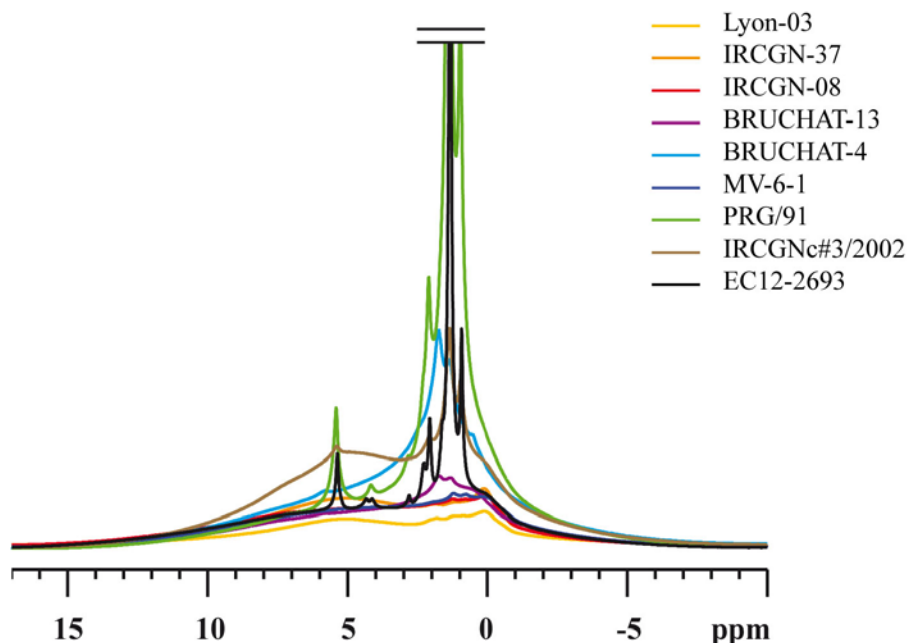


Figure 127 – Superposition des spectres RMN du proton de 9 individus appartenant à la collection globale présentant des délais post mortem de 0 à 2000 ans

= : section des spectres de BRUCHAT-4 et d'IRCGNc-#3/2002 afin d'aider à la visualisation.

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg.

EC12-2693 (IPM = 0 an) ; IRCGNc-#3/2002 (IPM = 10 ans) ; PRG/91 (IPM = 22 ans) ; MV-6-1 (IPM = 32 ans) ; BRUCHAT-4 (IPM = 50 ans) ; BRUCHAT-13 (IPM = 71 ans) ; IRCGN-08 (IPM ≈ 140 ans) ; IRCGN-37 (IPM ≈ 400 ans) ; LYON-03 (IPM ≈ 2 000 ans).

Masse sèche (EC12-2693) = 123,6 mg ; masse sèche (IRCGNc-#3/2002) = 128,3 mg ; masse sèche (PRG/91) = 118,6 mg ; masse sèche (MV-6-1) = 110,4 mg ; masse sèche (BRUCHAT-4) = 108,0 mg ; masse sèche (BRUCHAT-13) = 139,9 mg ; masse sèche (IRCGN-08) = 118,9 mg ; masse sèche (IRCGN-37) = 134,3 mg ; masse sèche (LYON-03) = 126,2 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

La superposition des spectres ne nous apporte d'informations supplémentaires. Nous allons donc étudier les variations observées au niveau de l'aire spectrale globale et des intensités des pics. Nous retrouvons les pics les plus intenses sur les échantillons BRUCHAT-4, PRG/91, et sur l'échantillon frais EC12-2693. Si nous comparons ces observations avec celles obtenues en RMN du carbone-13, nous constatons que pour BRUCHAT-4 et PRG/91, ces échantillons présentaient aussi une intensité spectrale augmentée ; en revanche, l'intensité de EC12-2693 n'est pas accrue. Nous pouvons expliquer ces résultats par le fait que les deux échantillons en question sont altérés et présentent un profil spectral différent.

1.1.2.1. Variation des aires spectrales

L'aire spectrale en RMN du proton tient compte des signaux lipidiques, de l'hydroxyapatite mais aussi du collagène contenu dans la matière organique. La Figure 128 représente les aires de tous les individus pour lesquels nous avons un fémur obtenues en RMN du proton en fonction de l'intervalle *post mortem*.

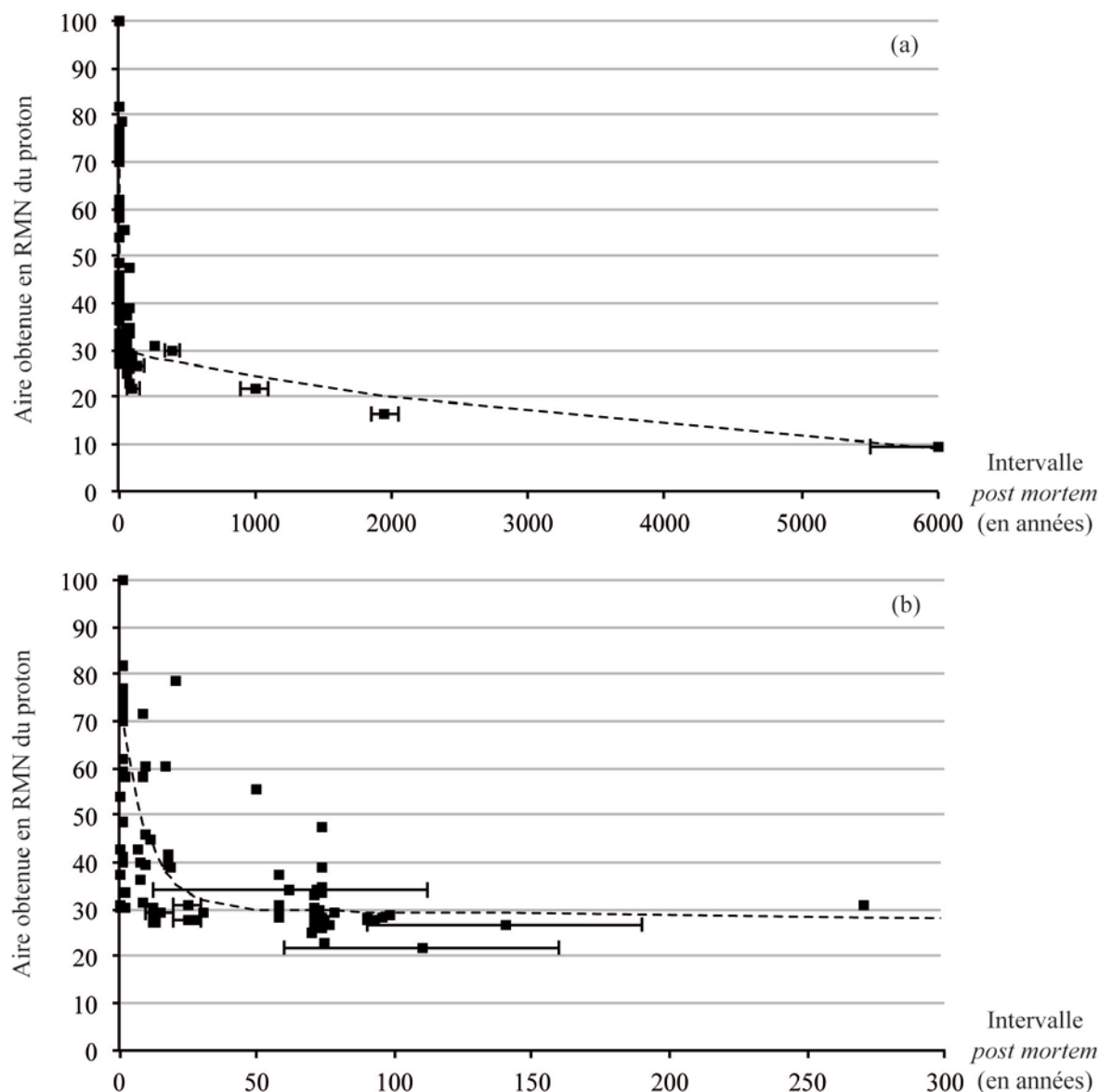


Figure 128 – Représentation graphique de l'aire mesurée en RMN du proton des individus de notre collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en fonction de l'intervalle *post mortem*

(a) pour tous les individus de la collection ($n = 97$) ; (b) pour les individus dont l'intervalle *post mortem* est inférieur à 300 ans ($n = 93$) ; --- : courbe ajustée selon l'équation bi-exponentielle [13].

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 5 ; la barre d'erreur verticale représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$ est contenue dans le symbole ; la barre d'erreur horizontale représente l'intervalle de confiance de l'estimation du délai *post mortem* lorsque la date de décès de l'individu n'est pas connue avec précision.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'ajustement : $A_1 = 45 \pm 5$; $A_2 = 30 \pm 5$; $T_S = 10 \pm 2$ ans et $T_L = 5000 \pm 1\,000$ ans.

Nous constatons une tendance à la baisse de l'aire en RMN du proton. De même, comme pour la RMN du carbone-13, nous avons tenté de simuler la décroissance du signal en fonction de l'intervalle *post mortem*. Nous observons une décroissance de même nature mais les constantes de temps sont différentes. En effet, les constantes paramétriques permettant la meilleure approximation pour notre équation [13] sont $A_1 = 45 \pm 5$; $A_2 = 30 \pm 5$; $T_S = 10 \pm 2$ ans et $T_L = 5\,000 \pm 1\,000$ ans. Nous obtenons une constante aux temps longs du même ordre que celle déterminée en RMN du carbone-13. En revanche, la décroissance est beaucoup plus rapide sur les temps courts (10 ans vs. 400 ans). Cette différence aux temps courts pour les analyses en RMN du proton s'explique par la contribution importante des lipides dans ce signal. Ainsi, une constante de temps courte aux temps courts indique une perte rapide du signal attribuable aux lipides et une constante de temps aux temps longs similaires entre les spectres RMN du carbone-13 et RMN du proton nous indique que la perte de la matière collagénique nécessite plus de temps.

Par ailleurs, nous constatons que la diminution de l'aire spectrale, bien qu'évidente, n'est pas du tout homogène entre tous les individus. Nous allons donc étudier les variations des intensités spectrales.

1.1.2.2. Variation des intensités spectrales

Afin de visualiser pour l'ensemble de notre collection globale les variations d'intensité, nous avons représenté sous forme graphique la variation au cours du temps de l'intensité de trois pics distincts :

- Celui des groupes méthylène CH_2 des acides gras des lipides résonnant entre 1,20 et 1,43 ppm : il est le pic le plus intense des lipides (Figure 129) ;
- Celui du groupe méthine $-\text{CH}=\text{CH}-$ des acides gras : il indique une insaturation dans les chaînes aliphatiques des lipides (Figure 130) ;
- Celui du groupe hydroxyle OH de l'hydroxyapatite (Figure 131).

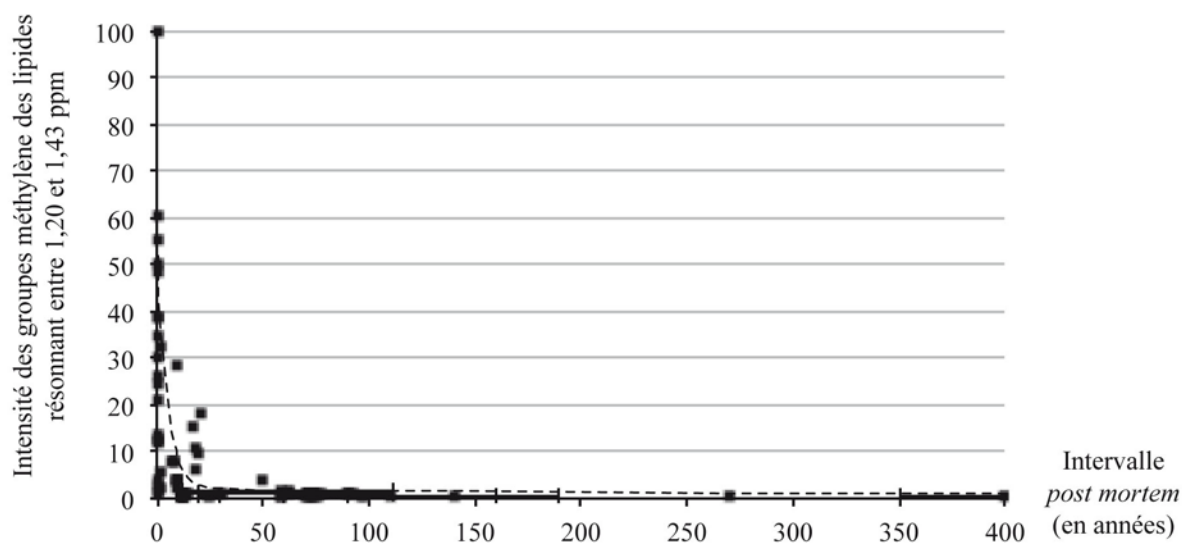


Figure 129 – Représentation graphique de l'intensité des groupes méthylène (CH_2)_n des acides gras des lipides (résonnant entre 1,20 et 1,43 ppm) des individus de notre collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du proton en fonction de l'intervalle *post mortem*

Pour tous les individus de la collection pour lesquels ce pic est mesurable ($n = 93$) ; --- : courbe ajustée selon l'équation bi-exponentielle [13].

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 5 ; la barre d'erreur verticale représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$ est contenue dans le symbole ; la barre d'erreur horizontale représente l'intervalle de confiance de l'estimation du délai *post mortem* lorsque la date de décès de l'individu n'est pas connue avec précision.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'ajustement : $A_1 = 50 \pm 5$; $A_2 = 2 \pm 1$; $T_S = 5 \pm 2$ ans et $T_L = 5\,000 \pm 1\,000$ ans.

Ce pic de résonance attribuable aux lipides est présent essentiellement dans les décennies voire les premiers siècles suivant le décès. Sa décroissance est rapide et nous ne pouvons plus le détecter au delà de 400 ans. Un individu (BRUULB-10) présente une intensité très forte pour ce pic, bien supérieure à celle des autres sujets ayant le même délai *post mortem*.

La valeur du préfacteur A_2 est petite, cela indique une contribution de la décroissance aux temps longs faible : le système présente donc essentiellement une décroissance monoexponentielle aux temps courts avec aux temps longs, la décroissance est attribuable à la matière organique.

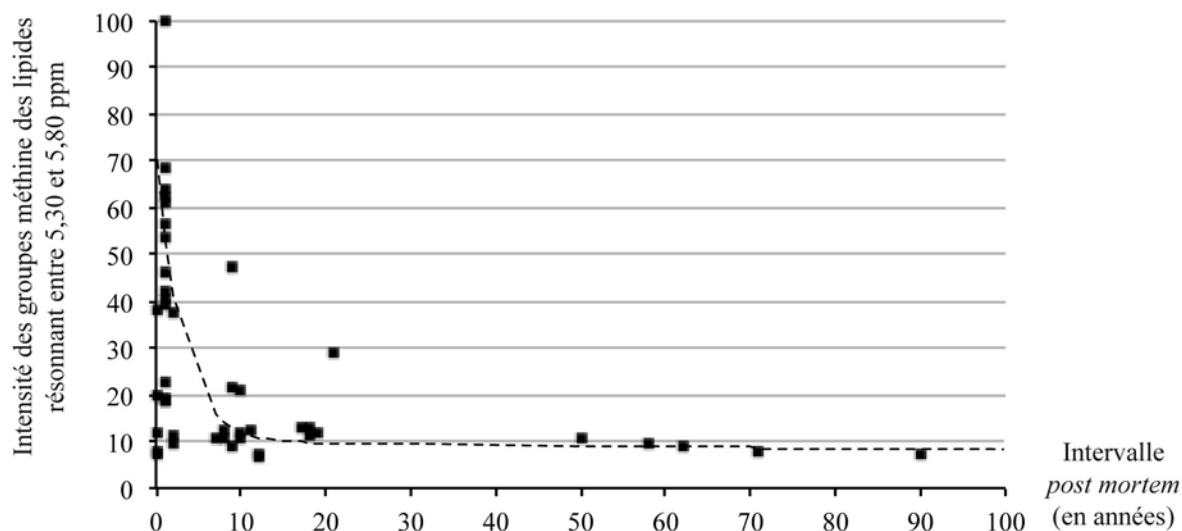


Figure 130 – Représentation graphique de l'intensité des groupes méthine $-CH=CH-$ des acides gras des lipides (résonnant entre 5,30 et 5,80 ppm) des individus de notre collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du proton en fonction de l'intervalle *post mortem*

Pour tous les individus de la collection pour lesquels ce pic est mesurable ($n = 45$) ; --- : courbe ajustée selon l'équation bi-exponentielle [13].

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 5 ; la barre d'erreur verticale représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$ est contenue dans le symbole ; la barre d'erreur horizontale représente l'intervalle de confiance de l'estimation du délai *post mortem* lorsque la date de décès de l'individu n'est pas connue avec précision.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'ajustement : $A_1 = 60 \pm 5$; $A_2 = 10 \pm 5$; $T_S = 3 \pm 1$ ans et $T_L = 5\,000 \pm 1\,000$ ans.

Attribuable aussi aux lipides, ce pic présente une décroissance encore plus rapide que le précédent. En effet, nous ne le retrouvons plus sur les échantillons dont le délai *post mortem* est supérieur à 90 ans. Le même individu (BRUULB-10) présente une intensité extrême pour ce pic.

Ces deux derniers pics, attribuables aux acides gras des lipides, ne sont donc présents que si le délai *post mortem* est relativement court. La perte des groupes méthine ($CH=CH$) est plus rapide que celles des groupes méthylène (CH_2) comme le montre les constantes de temps aux temps courts et par le fait que nous ne les détectons plus sur des os anciens.

L'évolution du pic relatif au groupe hydroxyle de l'hydroxyapatite évolue différemment au cours du temps, il ne suit plus le schéma d'une décroissance bi-exponentielle. Il semblerait que son intensité tende à la stabilité voire à une légère augmentation dans les premiers siècles suivants le décès avant de diminuer pour les intervalles *post mortem* les plus longs. Nous

utiliserons donc une équation simulant une phase de croissance aux temps courts suivie d'une décroissance aux temps longs de type :

[14]

avec $I(IPM)$ l'intensité spectrale en fonction de l'intervalle *post mortem* ; A_1 et A_2 les préfacteurs donnant les proportions des deux fonctions ; IPM l'intervalle *post mortem* en années ; T_G la constante aux temps courts durant la phase d'augmentation de l'intensité; et T_L la constante aux temps longs.

La représentation graphique est donnée dans la Figure 131.

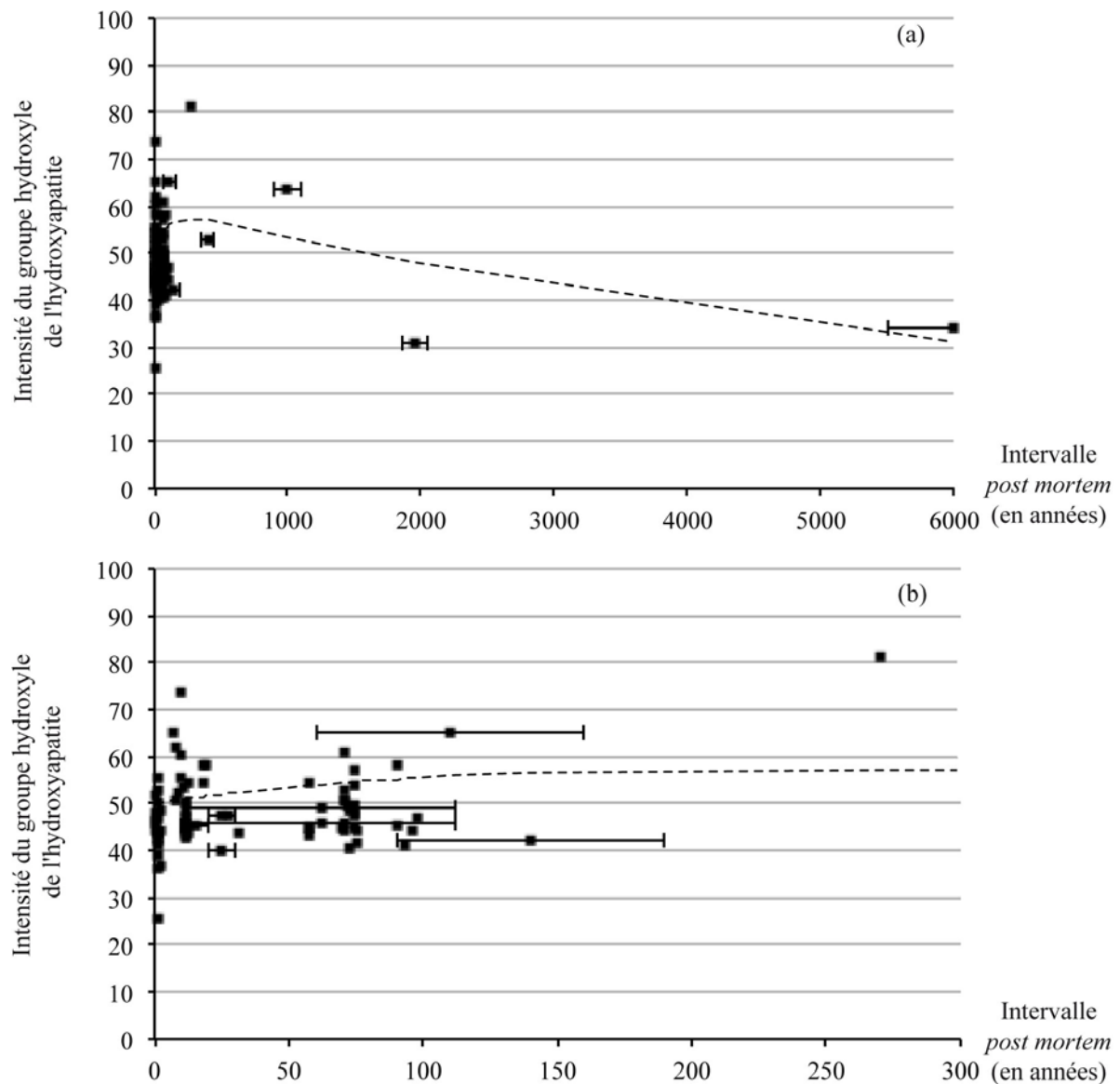


Figure 131 – Représentation graphique de l'intensité des groupes hydroxyle de l'hydroxyapatite (résonnant entre 0,10 et 0,20 ppm) des individus de notre collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du proton en fonction de l'intervalle *post mortem*

(a) pour tous les individus de la collection pour lesquels ce pic est mesurable ($n = 88$) ; (b) pour les individus de la collection pour lesquels ce pic est mesurable et dont l'intervalle *post mortem* est inférieur à 300 ans ($n = 84$) ; --- : courbe ajustée selon l'équation bi-exponentielle [14].

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 5 ; la barre d'erreur verticale représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7$ % est contenue dans le symbole ; la barre d'erreur horizontale représente l'intervalle de confiance de l'estimation du délai *post mortem* lorsque la date de décès de l'individu n'est pas connue avec précision.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'ajustement : $A_1 = 10 \pm 5$; $A_2 = 50 \pm 5$; $T_G = 100 \pm 10$ ans et $T_L = 7\,000 \pm 1\,000$ ans.

Concernant ce pic, attribuable aux groupes hydroxyle de l'hydroxyapatite, son intensité apparaît relativement stable au cours des premières années suivant le décès puis diminue pour les délais *post mortem* les plus longs.

1.1.3. Synthèse des observations sur notre collection globale

Nous avons pu observer différents comportements des constituants du tissu osseux en fonction de l'intervalle *post mortem*. Les aires et intensités obtenues en RMN du carbone-13 diminuent avec l'augmentation de l'intervalle *post mortem* mais restent détectables même pour des temps longs. En revanche, en RMN du proton, nous observons un comportement différent entre les pics attribuables aux lipides, qui ont une décroissance très rapide et ne sont plus détectables au delà de 300 ans, et le pic attribuable à l'hydroxyapatite qui reste stable dans les premières décennies suivant le décès avant de diminuer.

En RMN du carbone-13, la diminution du signal en fonction du temps suit un processus bi-exponentiel. Les aires et intensités spectrales possèdent les mêmes constantes de temps aux temps courts (entre 400 et 500 ans) et aux temps longs (entre 7 000 et 10 000 ans). Cette décroissance du signal est principalement due à la dégradation du collagène de type I contenu dans le tissu osseux. La fraction lipidique ne contribuant que très peu au signal, son influence sur les constantes de temps est négligeable.

En RMN du proton, les constantes de temps aux temps courts apparaissent plus petites pour l'aire et pour les pics attribuables à la fraction lipidique. La dégradation des lipides est donc très rapide. En revanche, les constantes de temps aux temps longs sont similaires à celles observées en RMN du carbone-13 ce qui confirme que la décroissance aux temps longs est liée à la dégradation du collagène. Le pic attribuable aux groupes hydroxyle de l'hydroxyapatite présente un comportement différent avec une constante de croissance suivie d'une constante de décroissance.

Nous notons quand même de grandes disparités entre les échantillons que ce soit au niveau des aires ou des intensités spectrales. Plusieurs hypothèses peuvent alors être émises : d'une part, la nature du milieu de conservation des individus qui peut jouer un rôle sur la préservation ou la dégradation des constituants du tissu osseux ; et d'autre part, la présence dans notre collection globale d'individu présentant des traces de transformation adipocireuse et qui présentent donc des profils spectraux modifiés pouvant éventuellement biaiser les représentations graphiques. Nous avons donc réalisé les mêmes analyses mais en divisant notre collection globale en deux : les sujets ne présentant pas de transformation adipocireuse et les sujets en présentant une.

1.2. ANALYSE SUR LES ECHANTILLONS NON ALTERES

Nous disposons d'un effectif de 85 individus non altérés par une transformation adipocireuse (ratio ALICO < 2,75, partie 5, chapitre 5.2, page 217). Ces individus se répartissent dans les différentes classes d'intervalle *post mortem* définies précédemment (Tableau 44).

Tableau 44 – Effectifs des individus non altérés pour lesquels nous disposons des fémurs par classe d'intervalle *post mortem*

Classes d'intervalle <i>post mortem</i> (ans)	Effectif (n)	Individus
[0-1]	21	- Collection École de chirurgie (n = 4) ; - BRUULB (n = 16) ; - MIL-L1F
[2-10]	6	- PRG717/2003 ; PRG1116/2004 ; PRG827/2004 ; PRG518/2005 ; PRG567/2010 ; PRG1021/2010 ;
[11-50]	25	- MV-6-1 ; - PRG242/93 ; PRG343/94 ; PRG342/94 ; PRG596/95 ; PRG709/2001 ; - IRCGN-01 ; IRCGN-02 ; IRCGN-03 ; IRCGN-38 ; - Collection Milan (n = 15)
[50-100]	26	- Simon VAL-06 ; Simon TRE-11 ; Simon AIG-43 ; Simon AIG-48 ; - Sorbey-1-1 ; MV-5 ; - IRCGN-06 ; IRCGN-15 à IRCGN-18 (n = 4) ; IRCGN-20 à IRCGN-35 (n = 13) ; - BRUCHAT-2 ; BRUMANAGE
[100-300]	3	- IRCGN-07 ; IRCGN-08 ; - SB3
> 300	4	- IRCGN-12 ; IRCGN-14 ; IRCGN-37 ; - LYON-03
n = 85		

Nous allons analyser les spectres obtenus en RMN du carbone-13 et en RMN du proton de quelques individus avant d'étudier plus en détails les aires et intensités spectrales obtenues pour tous les individus non altérés.

1.2.1. Analyse en RMN du carbone-13

Nous avons représenté les spectres RMN du carbone-13 de 9 individus non altérés ayant des délais *post mortem* compris entre 0 et 2 000 ans afin de mettre en évidence d'éventuelles modifications du signal en fonction du temps écoulé depuis le décès (Figure 132).

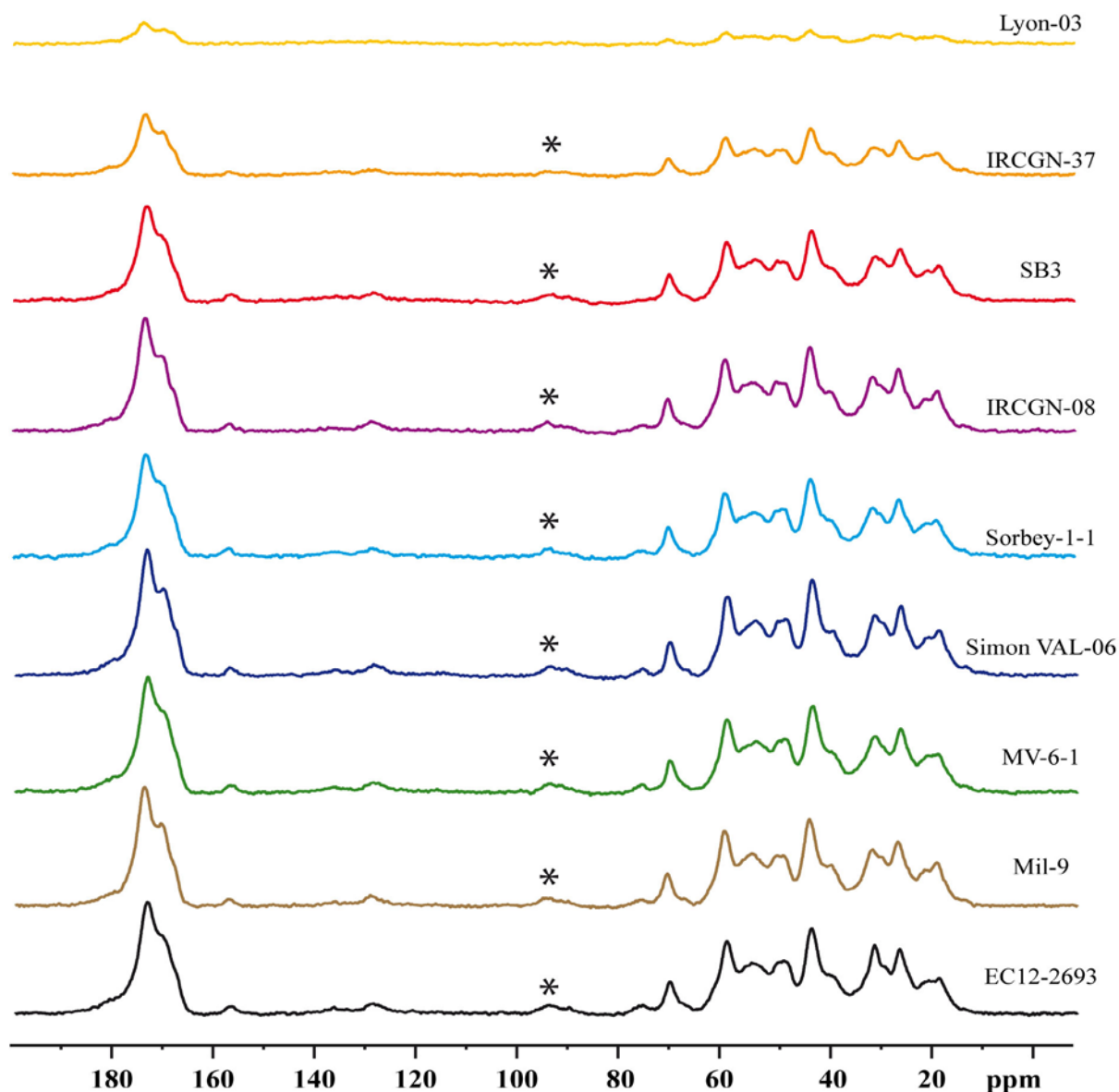


Figure 132 – Spectres RMN du carbone-13 des fémurs de 9 individus non altérés présentant des délais *post mortem* compris entre 0 et 2000 ans

* : bande de rotation.

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg.

EC12-2693 (IPM = 0 an) ; MIL-9 (IPM = 12 ans) ; MV-6-1 (IPM = 32 ans) ; Simon VAL-06 (IPM = 59 ans) ; Sorbey-1-1 (IPM = 99 ans) ; IRCGN-08 (IPM ≈ 140 ans) ; SB3 (IPM = 270 ans) ; IRCGN-37 (IPM ≈ 400 ans) ; LYON-03 (IPM ≈ 2 000 ans).

Masse initiale (EC12-2693) = 128,2 mg ; masse initiale (MIL-9) = 120,6 mg ; masse initiale (MV-6-1) = 112,3 mg ; masse initiale (Simon VAL-06) = 117,5 mg ; masse initiale (Sorbey-1-1) = 111,4 mg ; masse initiale (IRCGN-08) = 116,7 mg ; masse initiale (SB3) = 122,4 mg ; masse initiale (IRCGN-37) = 139,2 mg ; masse initiale (LYON-03) = 134,7 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Nous constatons que le signal apparaît plus homogène entre ces échantillons qu'entre les échantillons provenant de la collection globale (Figure 119 page 271). L'intensité du signal semble maintenue dans les premières décennies suivant le décès puis nous observons une diminution du signal qui paraît uniforme que ce soit au niveau du massif des groupes carboxyle ou de celui des chaînes aliphatiques. L'étude du rapport entre l'aire des chaînes aliphatiques et l'aire des groupes carboxyles (ratio ALICO), permet d'attester de l'homogénéité de la perte de signal entre ces deux massifs pour ces échantillons (représentation graphique dans la Figure 84 page 220 et données brutes fournies dans l'Annexe 8). En effet, le ratio ALICO reste stable ce qui indique une perte d'aire proportionnelle entre les chaînes aliphatiques et les groupes carboxyle. Parallèlement à cette perte de signal, nous pouvons observer une diminution de la résolution spectrale mise en évidence par une largeur de raie à mi-hauteur augmentée. Ces variations sont plus facilement visibles avec une superposition des spectres (Figure 133).

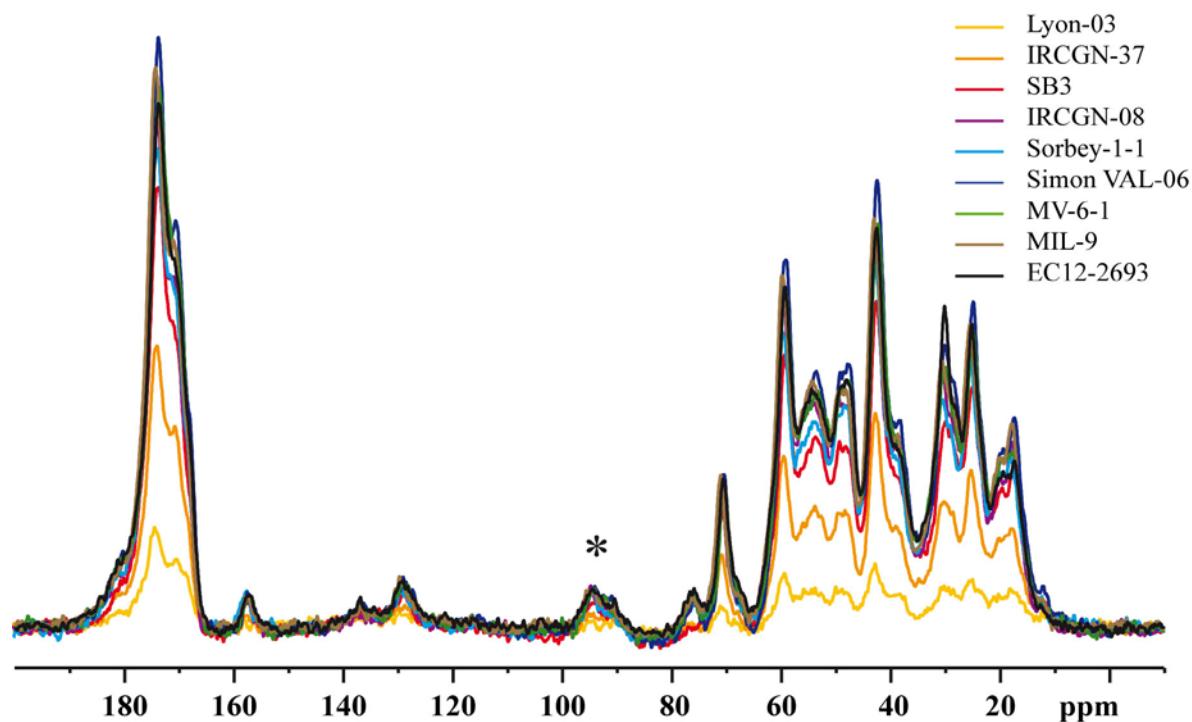


Figure 133 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 des fémurs de 9 individus non altérés présentant des délais *post mortem* compris entre 0 et 2000 ans

* : bande de rotation.

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg.

EC12-2693 (IPM = 0 an) ; MIL-9 (IPM = 12 ans) ; MV-6-1 (IPM = 32 ans) ; Simon VAL-06 (IPM = 59 ans) ; Sorbey-1-1 (IPM = 99 ans) ; IRCGN-08 (IPM ≈ 140 ans) ; SB3 (IPM = 270 ans) ; IRCGN-37 (IPM ≈ 400 ans) ; LYON-03 (IPM ≈ 2 000 ans).

Masse initiale (EC12-2693) = 128,2 mg ; masse initiale (MIL-9) = 120,6 mg ; masse initiale (MV-6-1) = 112,3 mg ; masse initiale (Simon VAL-06) = 117,5 mg ; masse initiale (Sorbey-1-1) = 111,4 mg ; masse initiale (IRCGN-08) = 116,7 mg ; masse initiale (SB3) = 122,4 mg ; masse initiale (IRCGN-37) = 139,2 mg ; masse initiale (LYON-03) = 134,7 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Les profils spectraux apparaissent similaires entre les différents échantillons, la principale différence provenant d'une diminution globale de signal augmentant avec l'intervalle *post mortem*. Afin de confirmer cette observation, nous allons considérer les aires et intensités spectrales mesurées pour tous les sujets ne présentant pas de contamination adipocireuse.

1.2.1.1. Analyse de la variation des aires spectrales

Nous avons représenté graphiquement les variations des aires spectrales des chaînes aliphatiques (Figure 134) et des groupes carboxyles (Figure 135) en fonction de l'intervalle *post mortem*. Comme pour la population globale, les aires spectrales diminuent avec le temps selon l'équation bi-exponentielle [13].

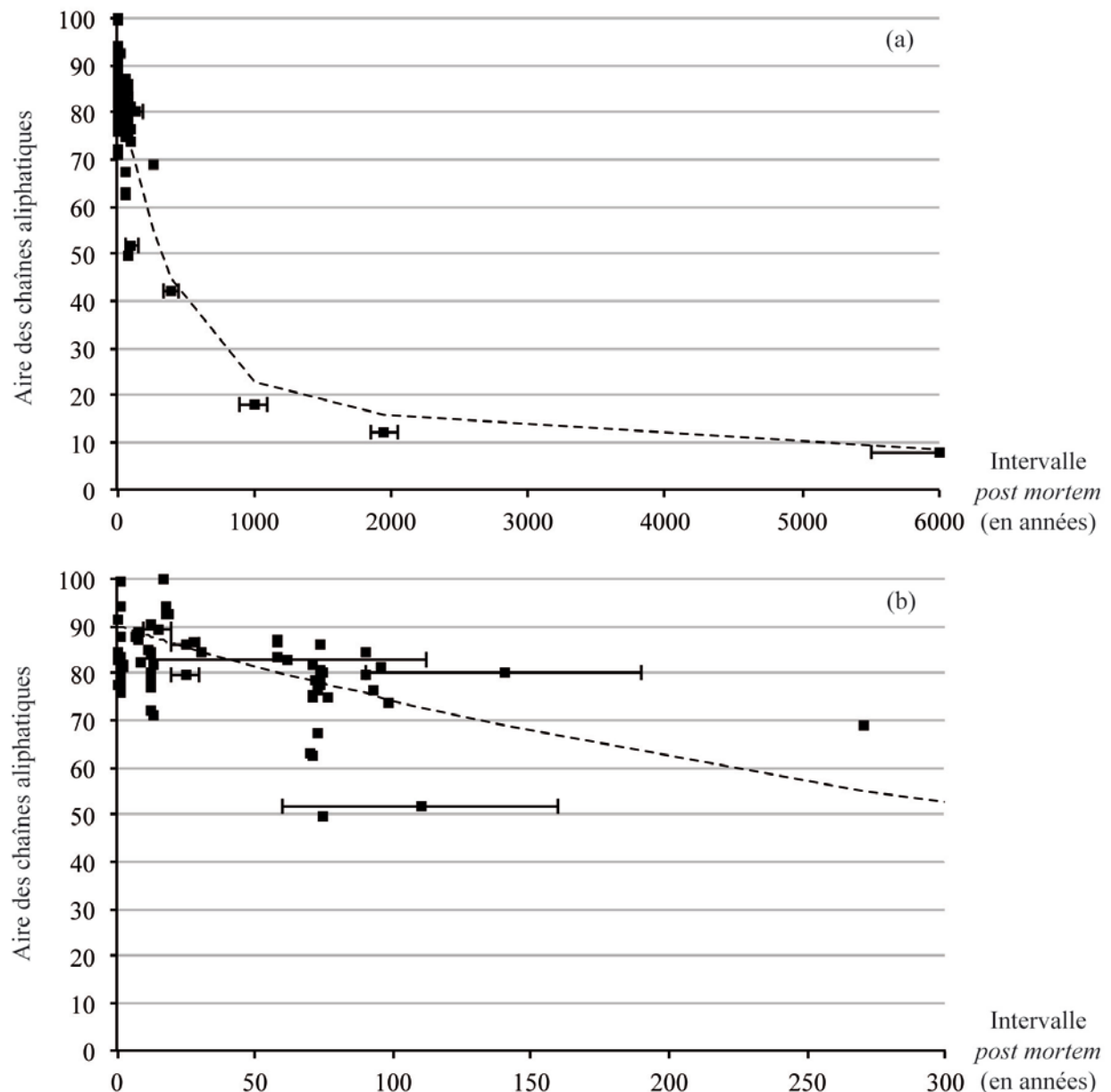


Figure 134 – Représentation graphique de l'aire des chaînes aliphatiques des individus non altérés pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle post mortem

(a) pour tous les individus non altérés de la collection ($n = 85$) ; (b) pour les individus non altérés dont l'intervalle *post mortem* est inférieur à 300 ans ($n = 81$) ; --- : courbe ajustée selon l'équation bi-exponentielle [13].

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 6 ; la barre d'erreur verticale représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$ est contenue dans le symbole ; la barre d'erreur horizontale représente l'intervalle de confiance de l'estimation du délai *post mortem* lorsque la date de décès de l'individu n'est pas connue avec précision.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'ajustement : $A_1 = 70 \pm 5$; $A_2 = 20 \pm 5$; $T_S = 400 \pm 100$ ans et $T_L = 7000 \pm 1\,000$ ans.

Sur la représentation graphique avec les intervalles *post mortem* longs, nous ne voyons pas de manière évidente de différence avec la figure qui incluait les individus altérés. En revanche, si nous ne considérons que les délais *post mortem* courts, nous constatons que les aires des chaînes aliphatiques présentent des valeurs moins dispersées, plus homogènes.

Au niveau du paramétrage de l'équation permettant de simuler les valeurs des aires des chaînes aliphatiques, les constantes paramétriques diffèrent lorsque les individus altérés ne sont pas pris en compte. Les nouvelles constantes sont $A_1 = 70$; $A_2 = 20$; $T_S = 400 \pm 100$ ans et $T_L = 7000 \pm 1\,000$ ans. L'augmentation de l'homogénéité entre les individus se traduit par des valeurs pour les préfacteurs A_1 et A_2 de l'équation [13] différents de ceux utilisés sur la population globale mais des constantes de temps aux temps courts et aux temps longs identiques.

Nous allons maintenant observer au niveau des groupes carboxyle s'il existe aussi des différences (Figure 135).

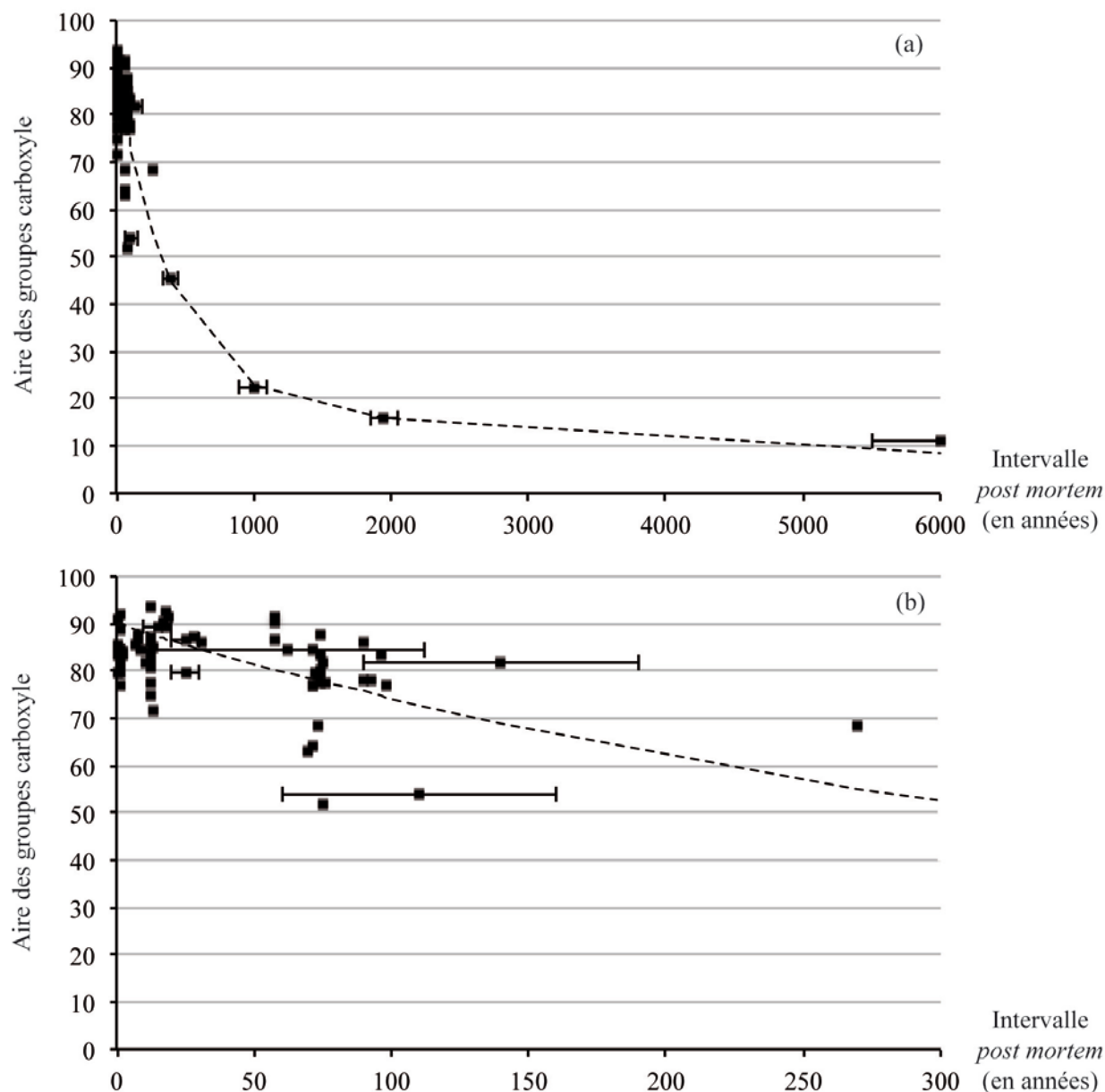


Figure 135 – Représentation graphique de l'aire des groupes carboxyle de tous les individus non altérés pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle *post mortem*

(a) pour tous les individus non altérés de la collection ($n = 85$) ; (b) pour les individus non altérés dont l'intervalle *post mortem* est inférieur à 300 ans ($n = 81$) ; --- : courbe ajustée selon l'équation bi-exponentielle [13].

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 6 ; la barre d'erreur verticale représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$ est contenue dans le symbole ; la barre d'erreur horizontale représente l'intervalle de confiance de l'estimation du délai *post mortem* lorsque la date de décès de l'individu n'est pas connue avec précision.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'ajustement : $A_1 = 70 \pm 5$; $A_2 = 20 \pm 5$; $T_S = 400 \pm 100$ ans et $T_L = 10\,000 \pm 1\,000$ ans.

Concernant l'aire des groupes carboxyle, nous ne notons aucun changement lorsque les individus présentant une altération ne sont pas pris en compte. Ceci s'explique par le fait que l'altération due à la transformation adipocireuse porte essentiellement sur une modification du

spectre au niveau des chaînes aliphatiques. Les paramètres utilisés pour simuler l'aire des groupes carboxyle sont donc les mêmes que ceux utilisés sur la population globale.

1.2.1.2. Analyse de la variation des intensités spectrales

Nous avons observé les intensités spectrales des 3 pics précédemment étudiés sur la population globale à savoir celui du C α de la glycine (Figure 136) ; celui du C β de la proline, du C β de l'arginine et des lipides (Figure 137) ; et celui attribuable à un des groupes carboxyle (Figure 138).

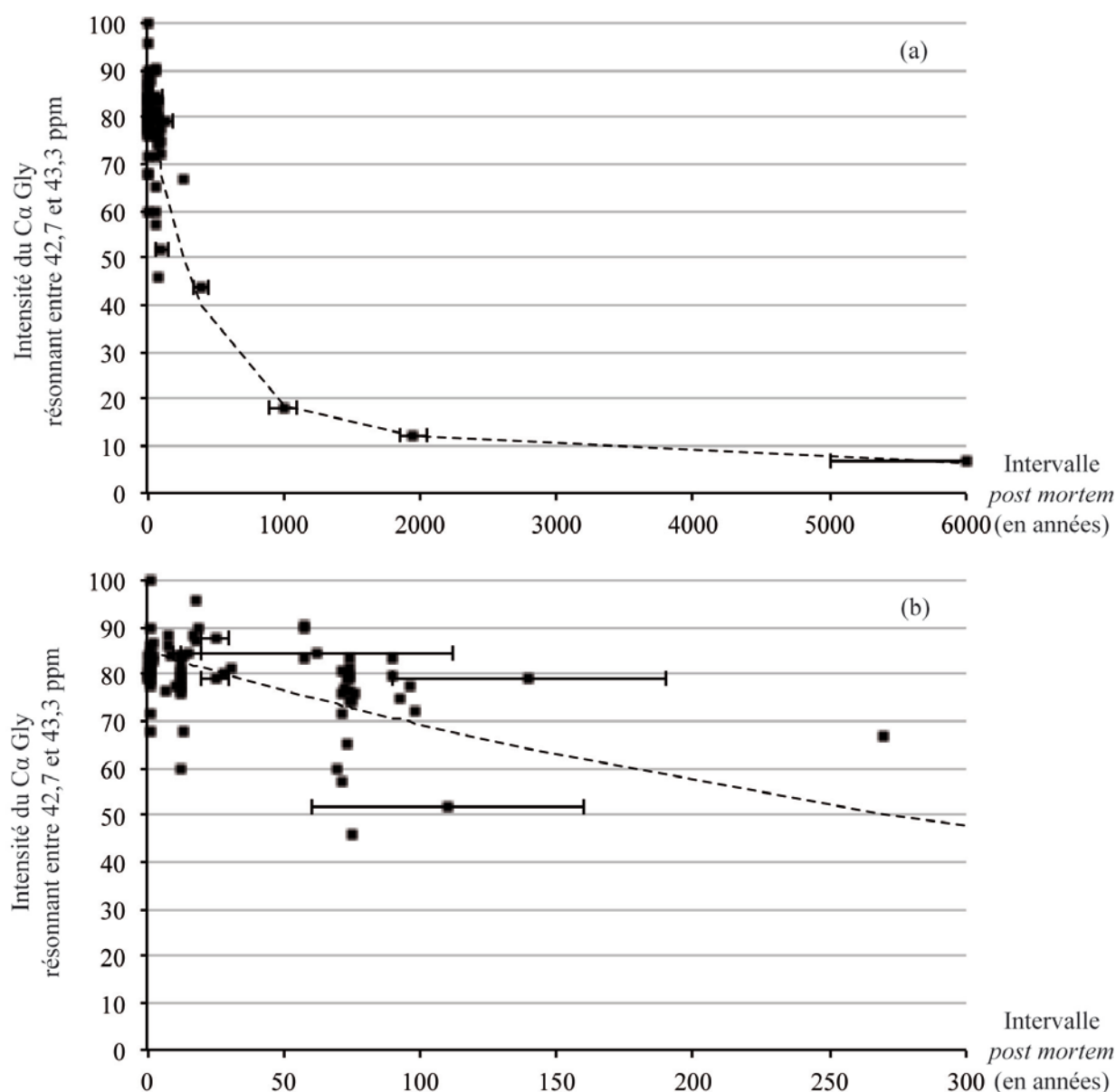


Figure 136 – Représentation graphique de l'intensité du Ca de la glycine (résonnant entre 42,7 et 43,3 ppm) des individus de non altérés pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle post mortem

(a) pour tous les individus non altérés de la collection ($n = 85$) ; (b) pour les individus non altérés dont l'intervalle *post mortem* est inférieur à 300 ans ($n = 81$) ; --- : courbe ajustée selon l'équation bi-exponentielle [13].

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 6 ; la barre d'erreur verticale représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$ est contenue dans le symbole ; la barre d'erreur horizontale représente l'intervalle de confiance de l'estimation du délai *post mortem* lorsque la date de décès de l'individu n'est pas connue avec précision.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'ajustement : $A_1 = 70 \pm 5$; $A_2 = 15 \pm 5$; $T_S = 400 \pm 100$ ans et $T_L = 7\,000 \pm 1\,000$ ans.

Les intensités observées pour ce pic ne diffèrent pas de celles obtenues sur la population globale. Nous constatons une diminution lente de son intensité en fonction de l'intervalle *post mortem*. Cependant, il existe une grande variabilité de cette intensité pour un même délai *post mortem* avec des valeurs obtenues pour des os datés d'une centaine d'années rentrant dans la variabilité des échantillons récents. Cette intensité demeure détectable sur des os d'intérêt archéologique.

L'absence de différence entre la population globale et les individus non altérés seuls provient du fait que la transformation adipocireuse ne concerne pas cette zone spectrale et n'interfère donc pas avec l'intensité de la glycine.

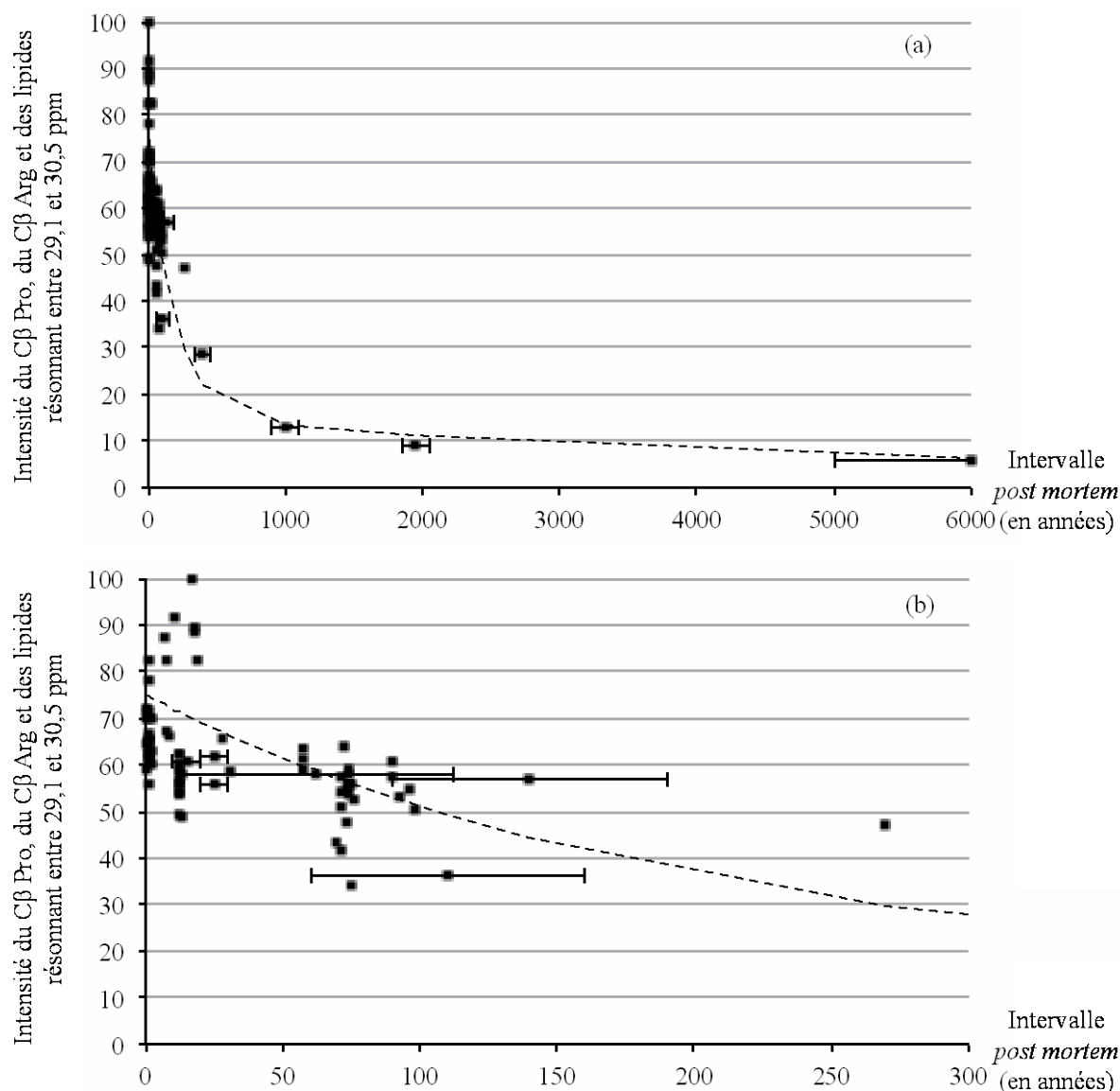


Figure 137 – Représentation graphique de l'intensité du C β de la proline, du C β de l'arginine et des groupes méthylène CH₂ des lipides (résonnant entre 29,1 et 30,5 ppm) des individus non altérés pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle *post mortem*

(a) pour tous les individus non altérés de la collection (n = 85) ; (b) pour les individus non altérés dont l'intervalle *post mortem* est inférieur à 300 ans (n = 81) ; --- : courbe ajustée selon l'équation bi-exponentielle [13].

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 6 ; la barre d'erreur verticale représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$ est contenue dans le symbole ; la barre d'erreur horizontale représente l'intervalle de confiance de l'estimation du délai *post mortem* lorsque la date de décès de l'individu n'est pas connue avec précision.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'ajustement : $A_1 = 60 \pm 5$; $A_2 = 15 \pm 5$; $T_S = 200 \pm 100$ ans et $T_L = 7\,000 \pm 1\,000$ ans.

Nous obtenons pour ce pic des valeurs d'intensités plus homogènes entre les individus non altérés ; les paramètres d'ajustement sont alors différents de ceux utilisés sur la population

globale. En effet, ce pic est notamment constitué des groupes méthylène des lipides qui sont augmentés dans les cas de transformation adipocireuse.

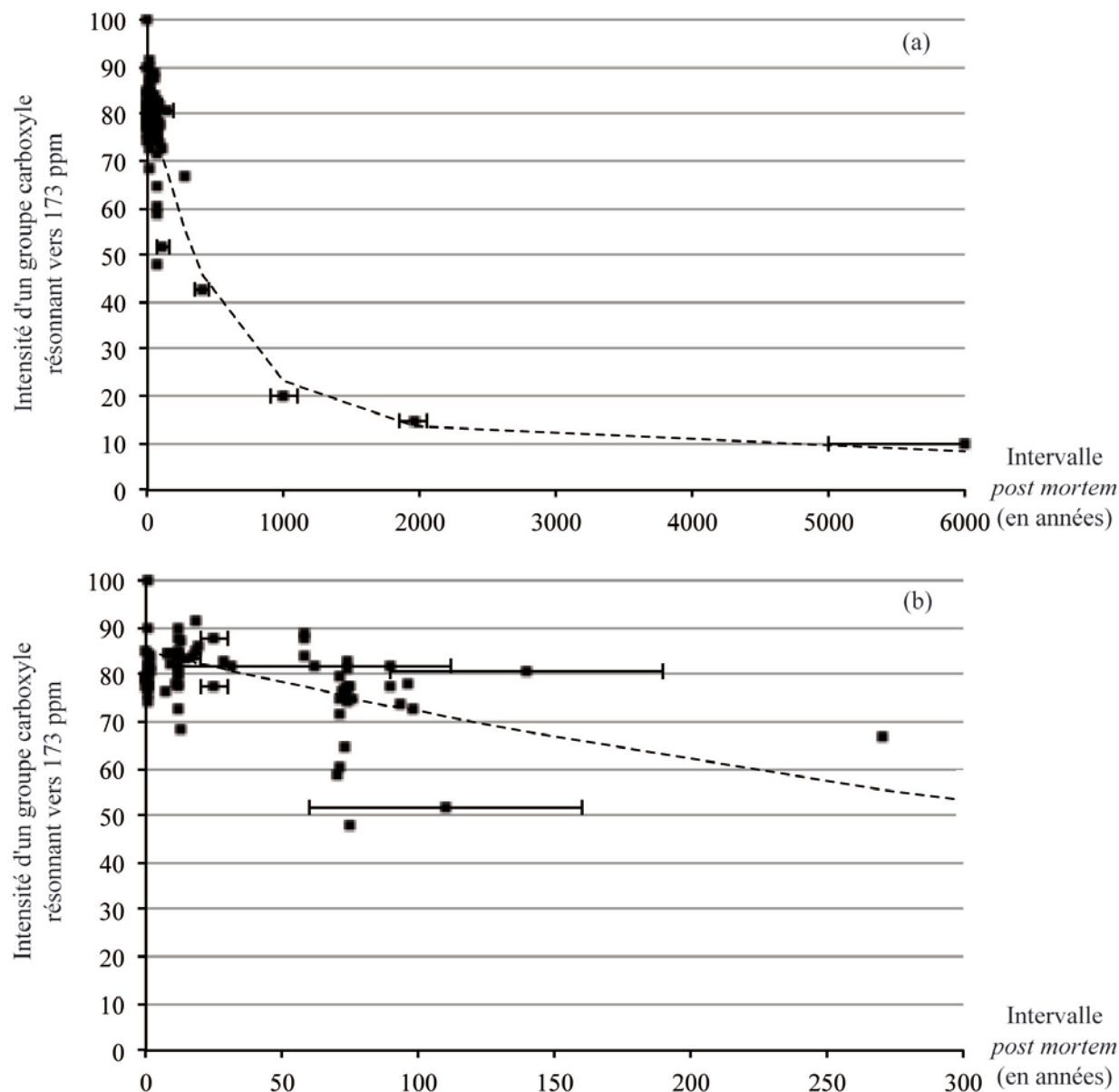


Figure 138 – Représentation graphique de l'intensité du pic le plus intense des groupes carboxyle (résonnant vers 173 ppm) des individus non altérés pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle *post mortem*

(a) pour tous les individus non altérés de la collection (n = 85) ; (b) pour les individus non altérés dont l'intervalle *post mortem* est inférieur à 300 ans (n = 81) ; --- : courbe ajustée selon l'équation bi-exponentielle.

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 6 ; la barre d'erreur verticale représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$ est contenue dans le symbole ; la barre d'erreur horizontale représente l'intervalle de confiance de l'estimation du délai *post mortem* lorsque la date de décès de l'individu n'est pas connue avec précision.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'ajustement : $A_1 = 70 \pm 5$; $A_2 = 15 \pm 5$; $T_s = 500 \pm 100$ ans et $T_L = 10\,000 \pm 1\,000$ ans.

Comme pour l'aire des groupes carboxyle (Figure 135), cette intensité spectrale n'est pas influencée par les individus présentant une altération.

1.2.1.3. Synthèse des analyses sur les individus non altérés

Nous notons que le retrait des individus altérés de la population globale entraîne une modification des graphiques par une diminution de la variabilité des aires et des intensités pour lesquelles la fraction lipidique contribue. Ainsi les groupes carboxyle ou le C α de la glycine ne présentent pas de modifications majeures visibles au niveau des représentations graphiques et les préfacteurs A₁ et A₂, ainsi que les constantes de temps aux temps courts et aux temps longs sont identiques. En revanche, l'aire des chaînes aliphatiques et les pics ayant une contribution lipidique forte (essentiellement le pic obtenu en RMN du carbone-13 attribuable au C β de la proline, au C β de l'arginine et aux groupes méthylène CH₂ des lipides (résonnant entre 29,1 et 30,5 ppm)) présentent plus de variabilité lorsque les individus altérés sont pris en compte. D'une manière générale, nous observons un schéma général de baisse de l'intensité spectrale lorsque l'intervalle *post mortem* augmente.

1.2.2. Analyse en RMN du proton

Nous avons réalisé la comparaison des spectres RMN du proton sur les mêmes 9 individus qu'en RMN du carbone-13, ayant des délais *post mortem* compris entre 0 et 2 000 ans, afin d'identifier ici aussi d'éventuelles modifications du signal en fonction du temps écoulé depuis le décès (Figure 139).

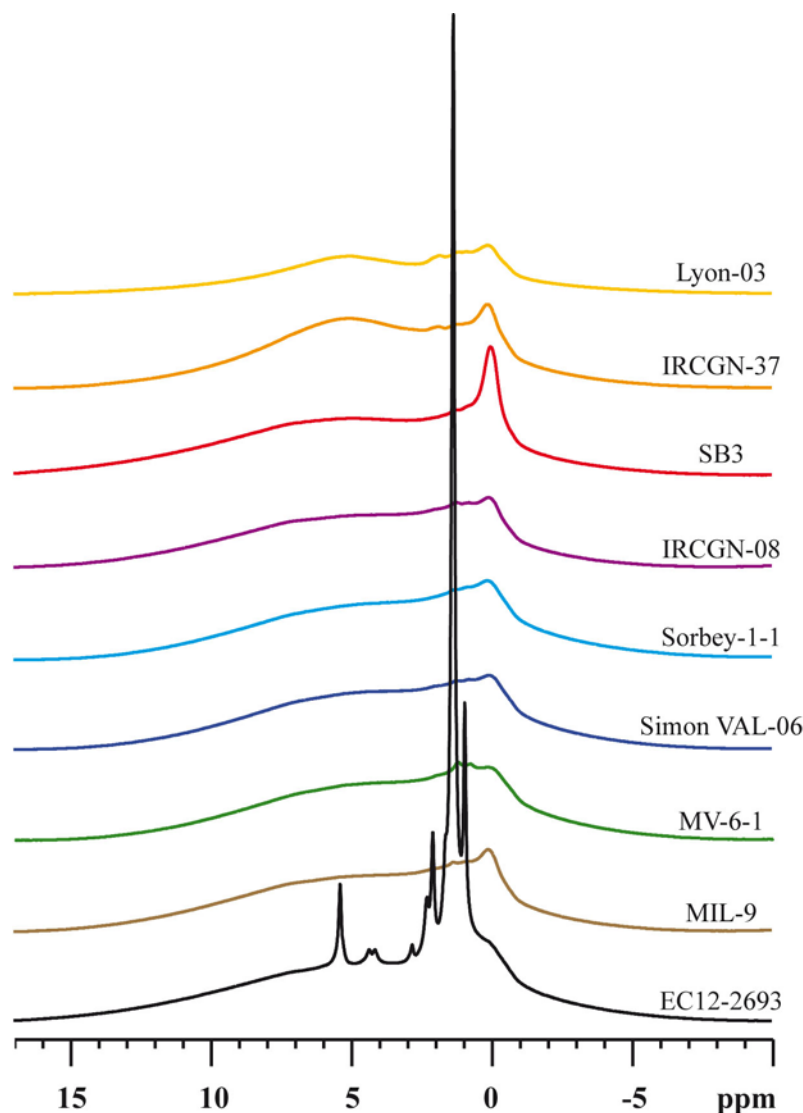


Figure 139 – Spectres RMN du proton de 9 individus non altérés présentant des délais *post mortem* de 0 à 2000 ans

De bas en haut : EC12-2693 (IPM = 0 an) ; MIL-9 (IPM = 12 ans) ; MV-6-1 (IPM = 32 ans) ; Simon VAL-06 (IPM = 59 ans) ; Sorbey-1-1 (IPM = 99 ans) ; IRCGN-08 (IPM \approx 140 ans) ; SB3 (IPM = 270 ans) ; IRCGN-37 (IPM \approx 400 ans) ; LYON-03 (IPM \approx 2 000 ans).

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; ; masse sèche (EC12-2693) = 123,6 mg ; masse sèche (MIL-9) = 118,2 mg ; masse sèche (MV-6-1) = 110,4 mg ; masse sèche (Simon VAL-06) = 123,4 mg ; masse sèche (Sorbey-1-1) = 116,4 mg ; masse sèche (IRCGN-08) = 118,9 mg ; masse sèche (SB3) = 100,5 mg ; masse sèche (IRCGN-37) = 134,3 mg ; masse sèche (LYON-03) = 126,2 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; D_1 = 5 s ; P_1 = 4,5 μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

La comparaison des spectres RMN du proton permet de mettre en évidence une perte rapide d'intensité au niveau des pics de résonance des lipides (compris entre 0,82 et 5,80 ppm). Concernant le pic résonnant entre 0,10 et 0,20 ppm attribuable au groupe hydroxyle de l'hydroxyapatite, nous constatons qu'il présente une variation d'intensité importante, ce que confirme la superposition des spectres (Figure 140). Ainsi au cours du temps, il semblerait que

l'intensité des pics attribuables aux lipides diminue alors que celle attribuable au groupe hydroxyle de l'hydroxyapatite augmente.

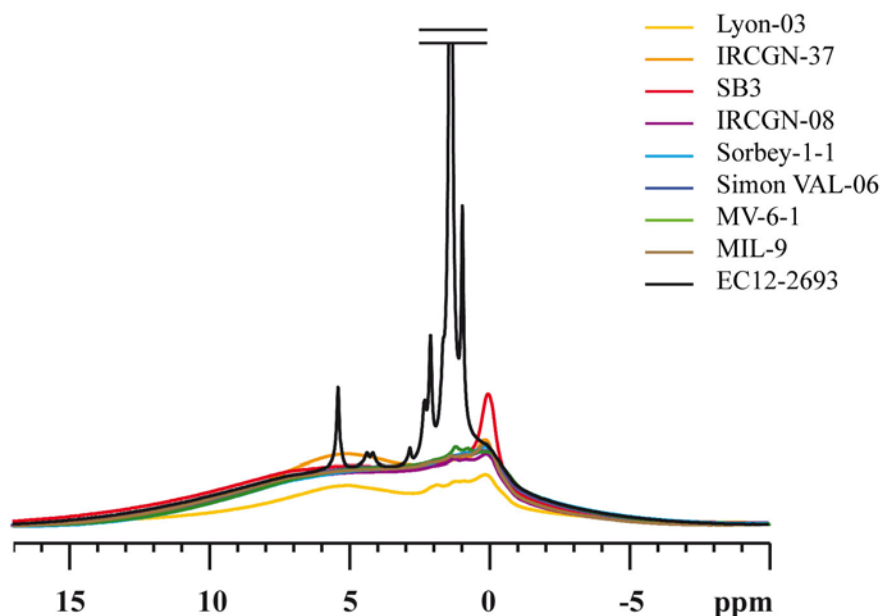


Figure 140 – Superposition des spectres RMN du proton de 9 individus non altérés présentant des délais *post mortem* de 0 à 2000 ans

= : section du spectre de EC12-2693 afin d'aider à la visualisation.

De bas en haut : EC12-2693 (IPM = 0 an) ; MIL-9 (IPM = 12 ans) ; MV-6-1 (IPM = 32 ans) ; Simon VAL-06 (IPM = 59 ans) ; Sorbey-1-1 (IPM = 99 ans) ; IRCGN-08 (IPM \approx 140 ans) ; SB3 (IPM = 270 ans) ; IRCGN-37 (IPM \approx 400 ans) ; LYON-03 (IPM \approx 2 000 ans).

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; ; masse sèche (EC12-2693) = 123,6 mg ; masse sèche (MIL-9) = 118,2 mg ; masse sèche (MV-6-1) = 110,4 mg ; masse sèche (Simon VAL-06) = 123,4 mg ; masse sèche (Sorbey-1-1) = 116,4 mg ; masse sèche (IRCGN-08) = 118,9 mg ; masse sèche (SB3) = 100,5 mg ; masse sèche (IRCGN-37) = 134,3 mg ; masse sèche (LYON-03) = 126,2 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Afin de vérifier que cette perte d'intensité des lipides en fonction de l'intervalle *post mortem* concerne la totalité des individus non altérés, nous avons étudié leur aire ainsi que leurs intensités spectrales.

1.2.2.1. Analyse de la variation des aires spectrales

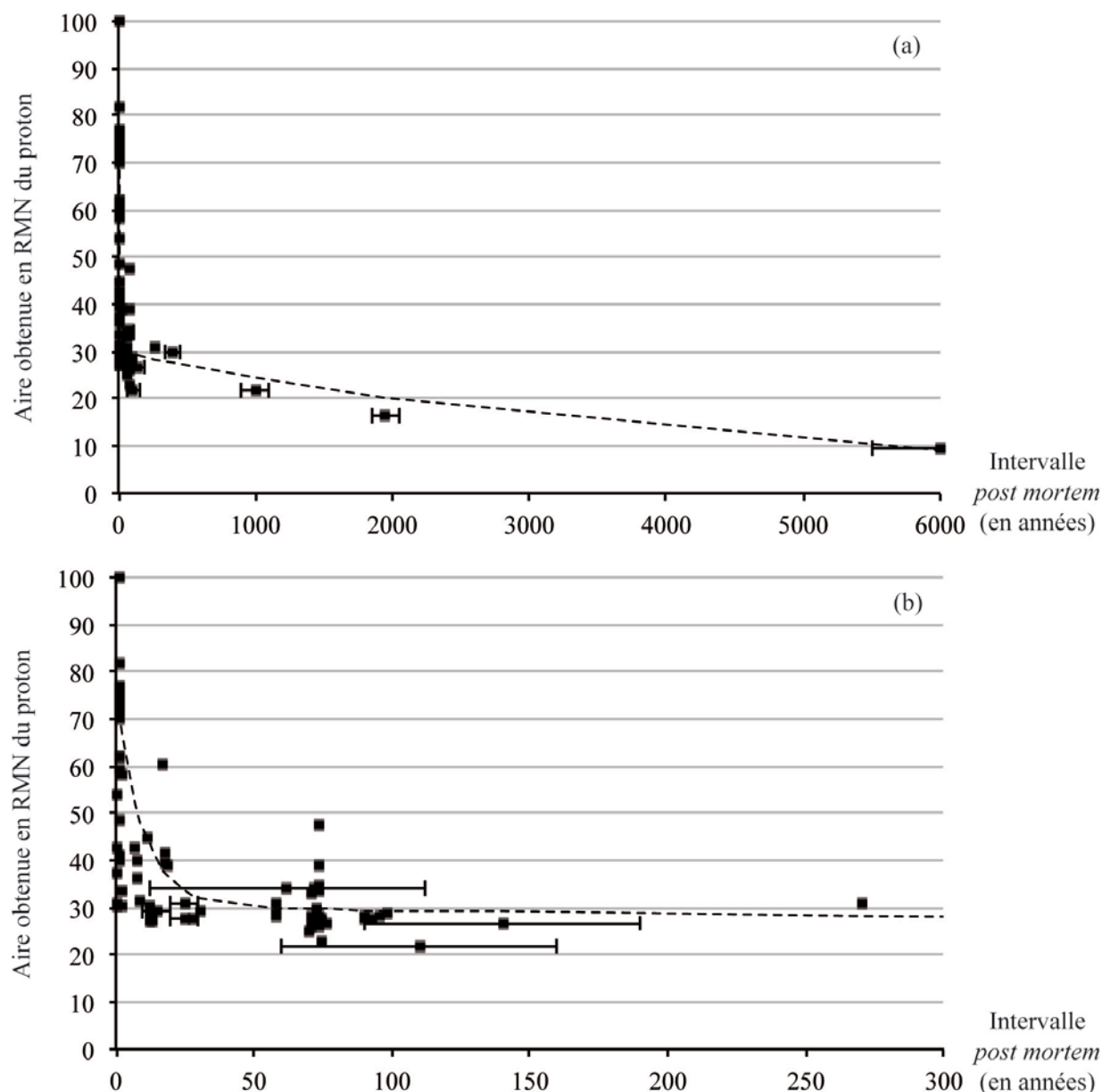


Figure 141 – Représentation graphique de l'aire mesurée en RMN du proton de tous les individus non altérés pour lesquels nous possédons un fémur en fonction de l'intervalle *post mortem*

(a) pour tous les individus non altérés de la collection ($n = 85$) ; (b) pour les individus non altérés dont l'intervalle *post mortem* est inférieur à 300 ans ($n = 81$) ; --- : courbe ajustée selon l'équation bi-exponentielle [13].

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 5 ; la barre d'erreur verticale représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$ est contenue dans le symbole ; la barre d'erreur horizontale représente l'intervalle de confiance de l'estimation du délai *post mortem* lorsque la date de décès de l'individu n'est pas connue avec précision.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'ajustement : $A_1 = 45 \pm 5$; $A_2 = 30 \pm 5$; $T_S = 10 \pm 5$ ans et $T_L = 5\,000 \pm 1\,000$ ans.

La variabilité des aires spectrales mesurées en RMN du proton semble identique entre la population globale et les individus non altérés. La variabilité est cependant légèrement plus réduite car les sujets altérés présentent des valeurs d'aires spectrales qui rentrent dans la variabilité de celle des sujets non altérés. Les paramètres de l'équation permettant une simulation restent très proches.

1.2.2.2. Variation des intensités spectrales

Comme en RMN du carbone-13, nous avons ici aussi comparé les intensités des trois mêmes pics que ceux utilisés sur la population globale. Pour les groupes méthylène les résultats sont présentés dans la Figure 142, pour les groupes méthine dans la Figure 143, et pour les groupes hydroxyle de l'hydroxyapatite dans la Figure 144.

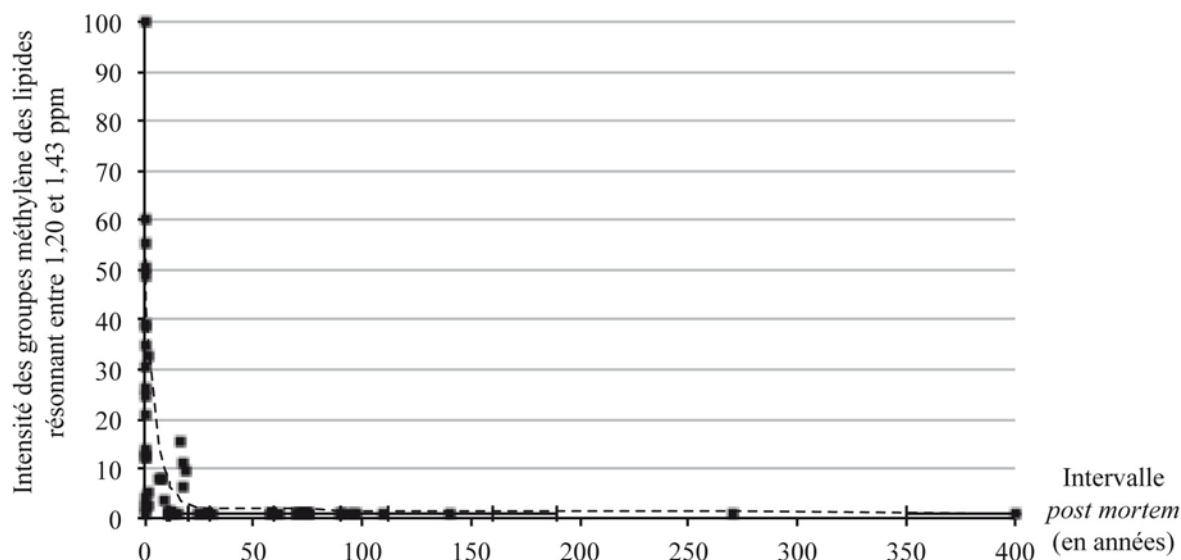


Figure 142 – Représentation graphique de l'intensité des groupes méthylène $(CH_2)_n$ des acides gras des lipides (résonnant entre 1,20 et 1,43 ppm) des individus non altérés pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du proton en fonction de l'intervalle *post mortem*

Pour tous les individus de la collection pour lesquels ce pic est mesurable ($n = 81$) ; --- : courbe ajustée selon l'équation bi-exponentielle [13].

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 5 ; la barre d'erreur verticale représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$ est contenue dans le symbole ; la barre d'erreur horizontale représente l'intervalle de confiance de l'estimation du délai *post mortem* lorsque la date de décès de l'individu n'est pas connue avec précision.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'ajustement : $A_1 = 50 \pm 5$; $A_2 = 2 \pm 1$; $T_S = 5 \pm 2$ ans et $T_L = 5\,000 \pm 500$ ans.

Nous constatons que l'intensité de ce pic décroît très vite en fonction du temps avec des valeurs qui se rapprochent de zéro dès 25 ans de délais *post mortem*. Cependant, même si sa

valeur est très faible, ce pic demeure détectable au delà de ce seuil de 25 ans d'intervalle *post mortem* mais il n'est plus présent sur les os archéologiques datés de plus de 400 ans et de ce fait, ne sont pas représentés dans le graphique. Nous retrouvons les mêmes résultats lorsque les individus altérés sont pris en compte (Figure 129 page 285).

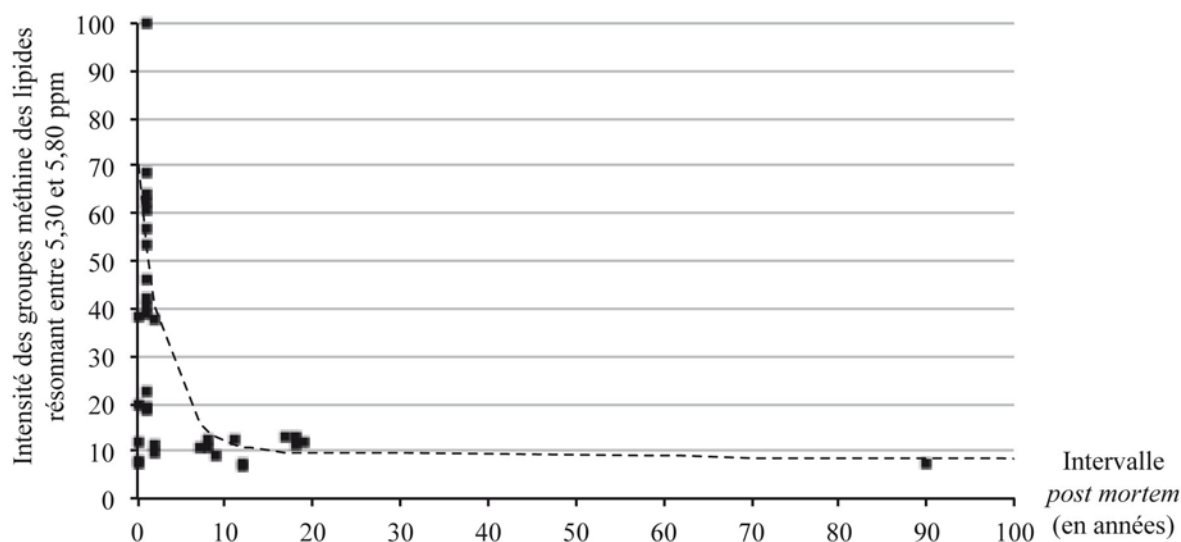


Figure 143 – Représentation graphique de l'intensité des groupes méthine $-CH=CH-$ des acides gras des lipides (résonnant entre 5,30 et 5,80 ppm) des individus non altérés pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du proton en fonction de l'intervalle *post mortem*

Pour tous les individus de la collection pour lesquels ce pic est mesurable ($n = 35$) ; --- : courbe ajustée selon l'équation bi-exponentielle [13].

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 5 ; la barre d'erreur verticale représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$ est contenue dans le symbole ; la barre d'erreur horizontale représente l'intervalle de confiance de l'estimation du délai *post mortem* lorsque la date de décès de l'individu n'est pas connue avec précision.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'ajustement : $A_1 = 60 \pm 5$; $A_2 = 10 \pm 5$; $T_S = 3 \pm 1$ an et $T_L = 5\,000 \pm 500$ ans.

Concernant ce pic de résonance, nous constatons ici aussi que son intensité décroît beaucoup plus rapidement pour ne plus devenir détectable sur les échantillons dont le délai *post mortem* est supérieur à 90 ans comparée à la population globale. Ce pic est constitué essentiellement du signal des groupes méthine des lipides ce qui explique sa dégradation rapide dans les années qui suivent le décès.

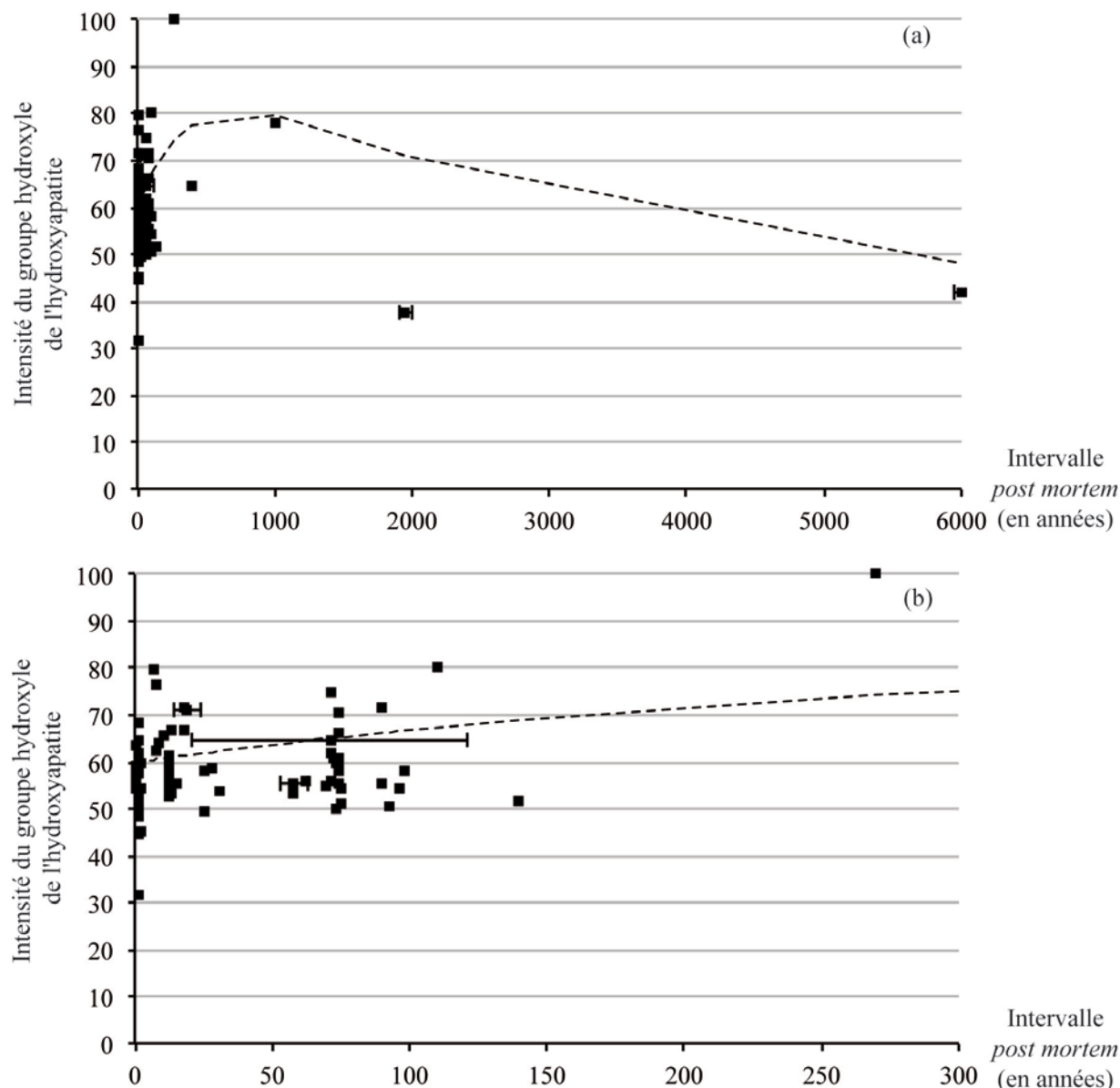


Figure 144 – Représentation graphique de l'intensité des groupes hydroxyle de l'hydroxyapatite (résonnant entre 0,10 et 0,20 ppm) des individus non altérés pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du proton en fonction de l'intervalle *post mortem*

(a) pour tous les individus de la collection pour lesquels ce pic est mesurable ($n = 80$) ; (b) pour les individus de la collection pour lesquels ce pic est mesurable et dont l'intervalle *post mortem* est inférieur à 300 ans ($n = 76$) ; --- : courbe ajustée selon l'équation bi-exponentielle [14].

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 5 ; la barre d'erreur verticale représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$ est contenue dans le symbole ; la barre d'erreur horizontale représente l'intervalle de confiance de l'estimation du délai *post mortem* lorsque la date de décès de l'individu n'est pas connue avec précision.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'ajustement : $A_1 = 40 \pm 5$; $A_2 = 60 \pm 5$; $T_G = 400 \pm 100$ ans et $T_L = 3\,000 \pm 1\,000$ ans.

En revanche, le pic correspondant à l'hydroxyapatite reste détectable sur tous les échantillons quel que soit le délai *post mortem*. Cependant, comparés à la population globale, ils présentent une variabilité plus faible.

1.2.3. Synthèse des analyses sur les individus non altérés

Il existe une diminution des intensités et des aires spectrales avec le temps qui est plus forte lorsqu'on ne tient pas compte des individus présentant une altération due à une transformation adipocireuse.

En RMN du carbone-13, que ce soit pour les individus de notre population globale ou nos individus non altérés, la diminution du signal en fonction du temps suit un processus bi-exponentiel. Concernant les aires et les intensités spectrales, nous ne retrouvons qu'une seule différence pour les constantes de temps au niveau du pic de résonance du C β de la proline, du C β de l'arginine et des groupes méthylène CH₂ des lipides (résonnant entre 29,1 et 30,5 ppm). Cette différence peut s'expliquer par la contribution des lipides pour ce pic que l'on ne retrouve pas pour les autres pics. Ainsi, la décroissance du signal est principalement due à la dégradation du collagène de type I contenu dans le tissu osseux.

En RMN du proton, nous retrouvons ici aussi des constantes de temps aux temps courts plus petites que celles obtenues en RMN du carbone-13 mais elles restent semblables à celles obtenues en RMN du proton. Comme pour notre collection globale, la dégradation de lipides se produit dans les temps courts alors que celle du collagène correspond aux temps longs. Pour le pic attribuable aux groupes hydroxyle de l'hydroxyapatite, on retrouve une constante de croissance suivie d'une constante de décroissance.

Malgré la présence d'un schéma de dégradation (décroissance bi-exponentielle pour les lipides et le collagène), de grandes variations pour les sujets récents persistent notamment pour les spectres en RMN du proton. Ceci est peut-être à mettre en relation avec une différence quantitative des lipides entre les femmes et les hommes, phénomène que nous avons déjà mis en évidence sur une collection récente lorsque nous avons traité des variations interindividuelles des constituants du tissu osseux (chapitre 5.3, page 172).

1.2.4. Interprétations statistiques

Que ce soit en RMN du carbone-13 ou du proton, nous constatons que la décroissance est quasi-linéaire dans les années suivants le décès puis il y a un amortissement dans la vitesse de décroissance. Cette première phase linéaire sur les temps courts, de l'ordre de 200-300 ans en

RMN du carbone-13 et d'environ 30-50 ans en RMN du proton nous autorise à mener des tests statistiques afin de vérifier la force de la corrélation à l'intervalle *post mortem*. Nous avons alors réalisé un test de corrélation utilisant le coefficient de corrélation linéaire de Pearson (cf. partie 4, chapitre 4.3, page 151). Les résultats du test appliqué aux aires et intensités spectrales en RMN du carbone-13 et du proton sont présentés dans le Tableau 45.

Tableau 45 – Synthèse des résultats concernant les tests statistiques sur l'influence de l'intervalle post mortem sur les aires et intensités spectrales mesurées, effectués sur les individus non altérés dont l'intervalle post mortem est inférieur à 300 ans

		Gamme de déplacements chimiques	Attribution	Influence		
				n	p	R ²
RMN du C ¹³	Aire	170 – 185	Groupe carboxyle	81	0*	0,20
		0 – 75	Chaîne aliphatique	81	0*	0,19
		182	Citrate	76	0,004*	0,11
		173	Groupe carboxyle 1	81	0*	0,20
		170	Groupe carboxyle 2	71	0,003*	0,12
		157,5 – 157,6	Cδ Arg	81	0,822	< 0,01
	Intensité	128,8 – 130	Composés aromatiques	81	0,001*	0,14
			Lipides			
		76	Citrate	77	0,054	0,05
		70,1 – 70,8	Cγ Hyp	81	0,001*	0,12
		58,2 – 59,7	Cα Pro, Cα Hyp	81	0*	0,19
		53,2 – 54	Cδ Hyp, Cα Glu	81	0*	0,21
		49,2 – 50,3	Cα Ala	61	0*	0,19
			Citrate			
		47,1 – 47,6	Cδ Pro	65	0*	0,20
		42,7 – 43,3	Cα Gly	81	0*	0,15
		37,6 – 38,8	Cβ Hyp	78	0*	0,16
		29,1 – 30,5	Cβ Pro, Cβ Arg	81	0*	0,22
			Lipides			
		24,1 – 25,2	Cγ Pro, Cβ Glu	81	0*	0,20
		19	Acides aminés minoritaires	79	0,014*	0,08
		16,4 – 18,8	Cβ Ala	81	0*	0,21
		12	Non attribué	77	0,019*	0,07
RMN du proton	Aire	-2 – 10	Matières organique et minérale	81	0*	0,17
		5,30 – 5,80	Lipides -CH=CH-	35	0,059	0,10
	Intensité	4,10 – 4,35	Lipides CH ₂ -OCOR	27	0,022*	0,19
		2,73 – 2,87	Lipides =HC-CH ₂ -CH	20	0,614	0,01
		2,25 – 2,36	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂ -	26	0,028*	0,19
		1,93 – 2,13	Lipides (CH ₂) _n -CH=CH-	52	0,005*	0,15
		1,55 – 1,70	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂ -	17	0,241	0,09
		1,20 – 1,43	Lipides (CH ₂) _n	80	0,001*	0,14
		0,82 – 0,94	Lipides CH ₃	80	0*	0,22
		0,10 – 0,20	Hydroxyapatite	76	0*	0,16

n : effectif ; R² : coefficient de détermination ; p : p-valeur donnant la probabilité au seuil α = 5 % ; **p*** indique une p-valeur inférieure ou égale à 0,05 ; les données brutes sont fournies en Annexes 7, 8, 9 et 10.

Au niveau des aires, que ce soit en RMN du carbone-13 ou du proton, nous constatons que les différences observées en fonction de l'intervalle *post mortem* sont significatives : le délai *post mortem* a donc une influence sur les mesures que nous réalisons. Cependant, les coefficients de

détermination ne sont pas très forts (entre 0,17 et 0,20) indiquant qu'une corrélation existe mais est faible. Concernant les intensités spectrales, 22 des 27 attributions en RMN du carbone-13 et du proton présentent des différences significatives au test. Ici aussi, les coefficients de détermination sont assez faibles, la corrélation est donc peu robuste. L'utilisation des aires et des intensités spectrales seules ne permet pas de réaliser un modèle prédictif de l'estimation de l'intervalle *post mortem*.

1.3. ANALYSE SUR LES ECHANTILLONS ALTERES PAR UNE TRANSFORMATION ADIPOCIREUSE

Au cours de notre étude, nous avons identifié certains échantillons comme présentant une contamination par une transformation adipocireuse de leur tissu adipeux. Cette transformation est mise en évidence par une augmentation de leur ratio ALICO indiquant une augmentation de l'aire relative aux chaînes aliphatiques des constituants du tissu osseux. Nous avons répertoriés dans le Tableau 46 les individus présentant cette altération.

Tableau 46 – Effectifs des individus altérés pour lesquels nous disposons des fémurs par classe d'intervalle post mortem

Classes d'intervalle <i>post mortem</i> (ans)	Effectif (n)	Individus
[2-10]	2	- IRCGNc-#6/2003 ; IRCGNc-#2/2003
[11-50]	5	- PRG/91 ; - IRCGNc-#3/2002 ; IRCGNc-#4/2002 ; IRCGNc-#9/2002 ; - BRUCHAT-4
[50-100]	5	- Simon AIG-10 ; - MV-13-1 ; - IRCGN-19 ; IRCGN-36 ; - BRUCHAT-13
n = 12		

Nous pouvons déjà constater que cette transformation adipocireuse ne concerne aucun individu dont le délai *post mortem* est inférieur à 2 ans ni aucun individu d'intérêt archéologique. Nous allons maintenant voir l'influence de cette altération sur les spectres obtenus en RMN du carbone-13 et du proton.

1.3.1. Analyse en RMN du carbone-13

Les échantillons que nous avons identifiés comme contaminés ont fait l'objet d'un traitement séparé puisque, comme nous l'avons démontré précédemment (cf. partie 5, chapitre 5.2, page

217), ils présentent un déséquilibre de leur ratio entre les chaînes aliphatiques et les groupes carboxyle. Les spectres de 7 individus altérés sont représentés dans la Figure 145.

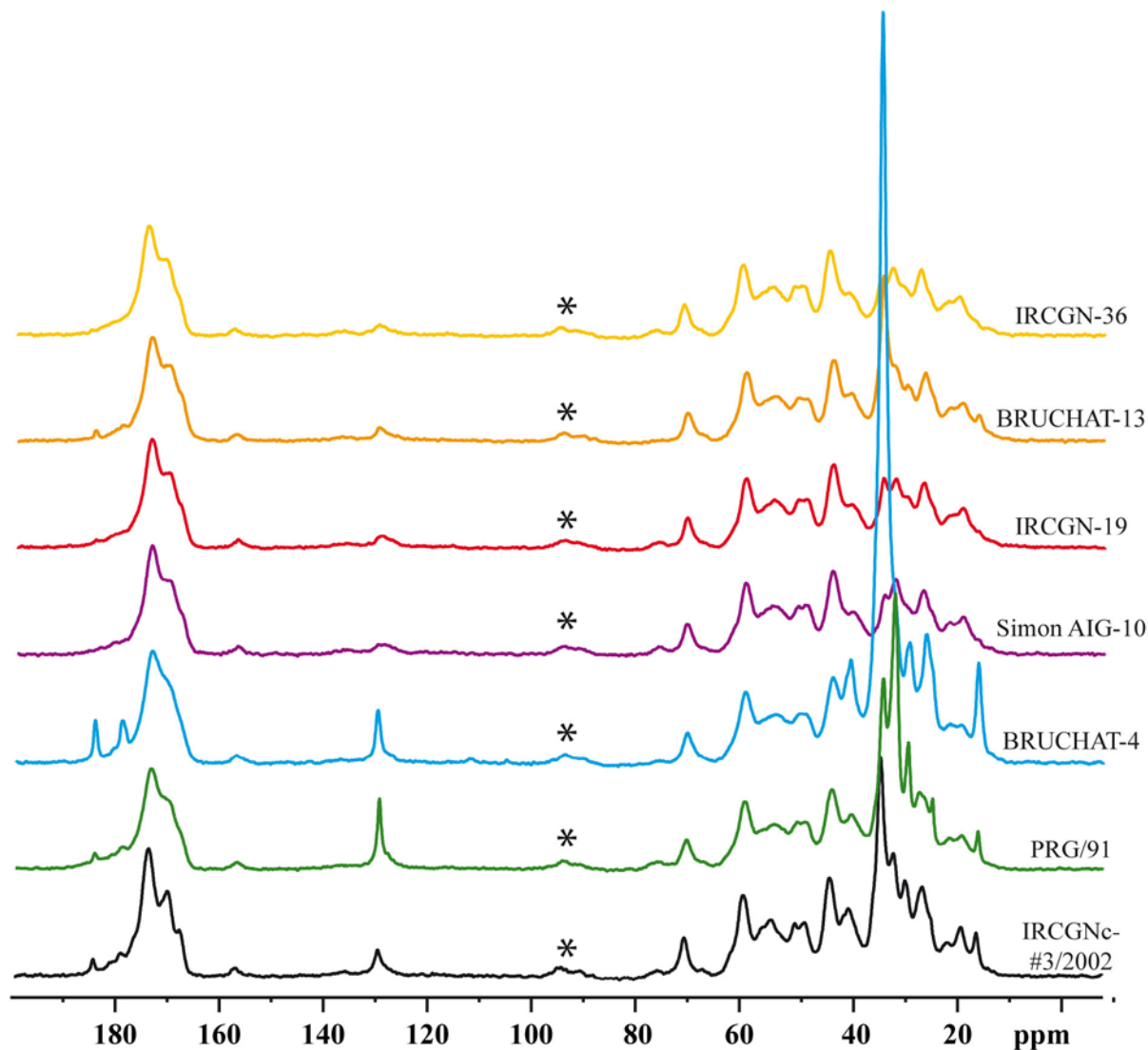


Figure 145 – Spectres RMN du carbone-13 de 7 individus présentant une altération ayant des intervalles *post mortem* compris entre 11 et 79 ans

* : bande de rotation.

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg.

IRCGNc-#3/2002 (IPM = 11 ans) ; PRG/91 (IPM = 22 ans) ; BRUCHAT-4 (IPM = 50 ans) ; Simon AIG-10 (IPM = 59 ans) ; IRCGN-19 (IPM = 72 ans) ; BRUCHAT-13 (IPM = 71 ans) ; IRCGN-36 (IPM = 79 ans).

Masse initiale (IRCGNc-#3/2002) = 135,3 mg ; masse initiale (PRG/91) = 148,2 mg ; masse initiale (BRUCHAT-4) = 131,8 mg ; masse initiale (Simon AIG-10) = 125,8 mg ; masse initiale (IRCGN-19) = 146,9 mg ; masse initiale (BRUCHAT-13) = 151,1 mg ; masse initiale (IRCGN-36) = 142,9 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Nous constatons que le pic à 33 ppm, caractéristique de la transformation adipocireuse, ne présente pas une intensité homogène entre tous nos échantillons. Il peut être très intense (BRUCHAT-4) ou inversement relativement discret avec comme seule manifestation un épaulement marqué du pic attribuable aux C β Pro, C β Arg et aux lipides résonnant entre 29,1 et 30,5 ppm (Simon AIG-10 et IRCGN-36 par exemple). Nous avons représenté les spectres de façon superposée afin d'identifier un éventuel schéma global de cette transformation adipocireuse (Figure 146).

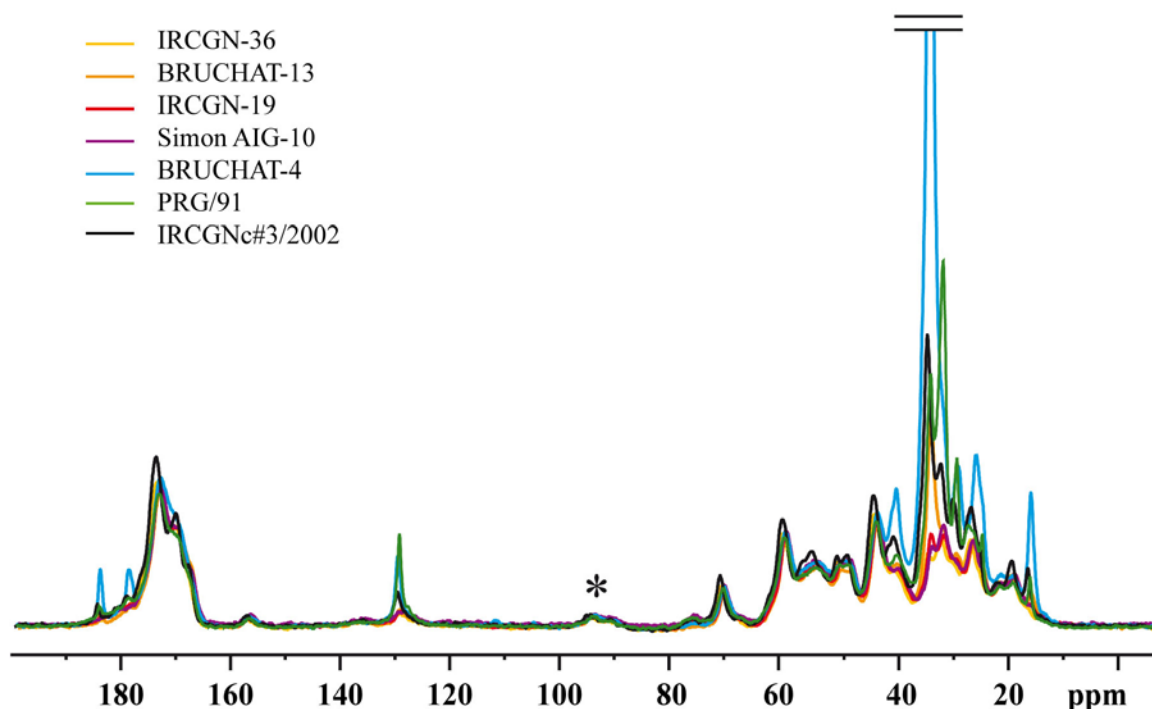


Figure 146 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 de 7 individus présentant une altération ayant des intervalles *post mortem* compris entre 11 et 79 ans

* : bande de rotation ; = : section du spectre de BRUCHAT-4 afin d'aider à la visualisation.

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg.

EC12-2693 (IPM = 0 an) ; IRCGNc-#3/2002 (IPM = 10 ans) ; PRG/91 (IPM = 22 ans) ; MV-6-1 (IPM = 32 ans) ; BRUCHAT-4 (IPM = 50 ans) ; BRUCHAT-13 (IPM = 71 ans) ; IRCGN-08 (IPM \approx 140 ans) ; IRCGN-37 (IPM \approx 400 ans) ; LYON-03 (IPM \approx 2 000 ans).

Masse initiale (EC12-2693) = 128,2 mg ; masse initiale (IRCGNc-#3/2002) = 135,3 mg ; masse initiale (PRG/91) = 148,2 mg ; masse initiale (MV-6-1) = 112,3 mg ; masse initiale (BRUCHAT-4) = 131,8 mg ; masse initiale (BRUCHAT-13) = 151,1 mg ; masse initiale (IRCGN-08) = 116,7 mg ; masse initiale (IRCGN-37) = 139,2 mg ; masse initiale (LYON-03) = 134,7 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; D₁ = 5 s ; P₁ = 2,85 μ s ; τ_c = 1,5 ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

La superposition des spectres ne nous apporte pas d'information nouvelle sur les altérations puisque l'intensité des pics est extrêmement variable entre les échantillons. Cependant, au niveau des pics non concernés par la contamination, comme ceux des groupes carboxyle et certains des chaînes aliphatiques (compris entre les déplacements chimiques du C α Gly résonnant entre 42,7

et 43,3 ppm et du citrate résonnant à 76 ppm), nous constatons que le profil spectral est conservé et qu'il y aurait même une légère diminution de l'intensité en fonction de l'intervalle *post mortem*.

Le nombre d'individus présentant une altération étant faible, nous avons réalisé l'analyse seulement au niveau des aires spectrales afin de voir si un schéma général existait en fonction de l'intervalle *post mortem*. Les représentations graphiques des aires des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle sont présentées dans la Figure 147 et la Figure 148.

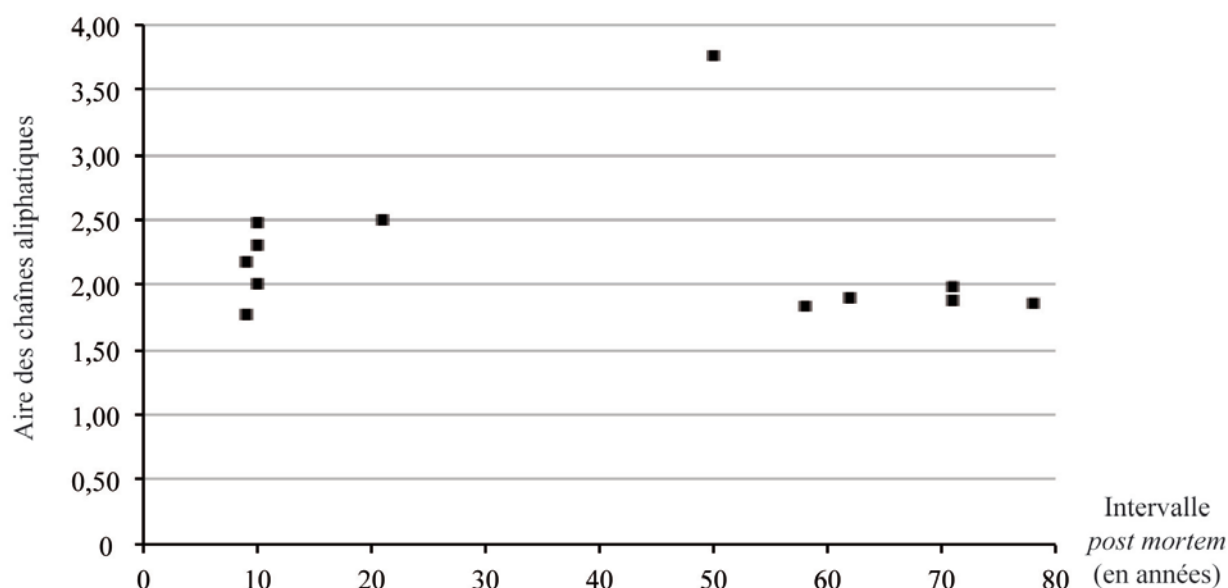


Figure 147 – Représentation graphique de l'aire des chaînes aliphatiques des individus altérés ($n = 12$) pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle *post mortem*

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 6 ; la barre d'erreur représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7 \%$ est contenue dans le symbole.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

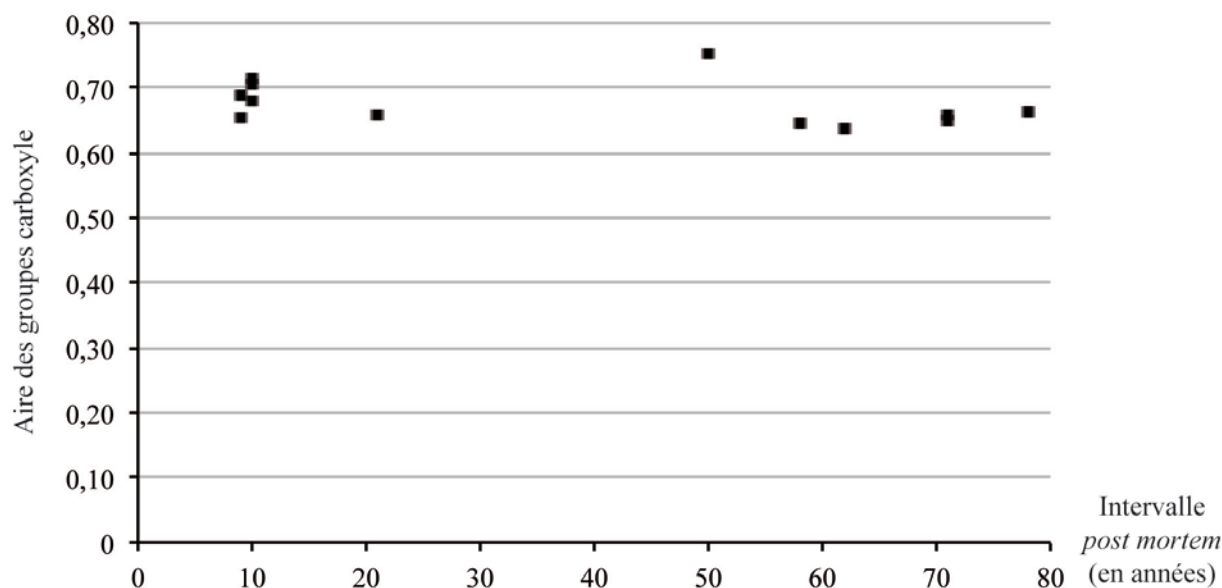


Figure 148 – Représentation graphique de l'aire des groupes carboxyle des individus altérés ($n = 12$) pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle *post mortem*

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 6 ; la barre d'erreur représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$ est contenue dans le symbole.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

L'aire des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle semblent constante au cours du temps. Devant la faiblesse de nos effectifs, il est très difficile de se prononcer davantage. La RMN du proton pourra apporter des informations supplémentaires par une étude plus spécifique de la fraction lipidique.

1.3.2. Analyse en RMN du proton

Précédemment, nous avons déterminé que l'altération des échantillons provenait de la présence d'adipocire au sein des os. Cette adipocire se compose essentiellement d'acides gras plus ou moins saturés en fonction du stade de formation de l'adipocire. Les spectres RMN du proton sont donc susceptibles de nous fournir des informations sur les lipides provenant de cette altération. Nous avons présenté dans la Figure 149 les spectres proton provenant des 7 individus précédemment étudiés en RMN du carbone-13.

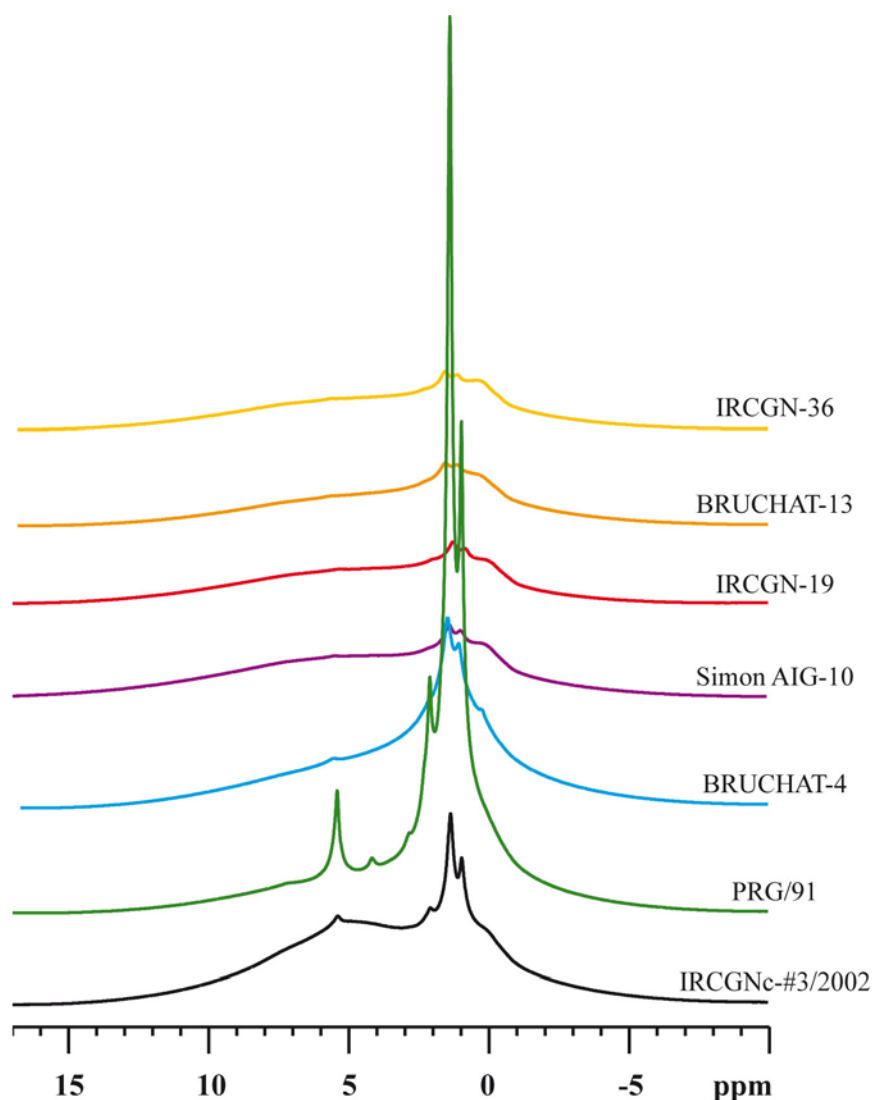


Figure 149 – Spectres RMN du proton de 7 individus présentant une transformation adipocireuse et ayant des intervalles *post mortem* compris entre 11 et 79 ans

De bas en haut : IRCGNc-#3/2002 (IPM = 11 ans) ; PRG/91 (IPM = 22 ans) ; BRUCHAT-4 (IPM = 50 ans) ; Simon AIG-10 (IPM = 59 ans) ; IRCGN-19 (IPM = 72 ans) ; BRUCHAT-13 (IPM = 71 ans) ; IRCGN-36 (IPM = 79 ans).

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; masse sèche (IRCGNc-#3/2002) = 128,3 mg ; masse sèche (PRG/91) = 118,6 mg ; masse sèche (BRUCHAT-4) = 108,0 mg ; masse sèche (Simon AIG-10) = 90,4 mg ; masse sèche (IRCGN-19) = 147,9 mg ; masse sèche (BRUCHAT-13) = 139,9 mg ; masse sèche (IRCGN-36) = 134,8 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Nous constatons que les échantillons contaminés présentent une persistance des pics de résonance attribuables aux groupes méthylène CH_2 des lipides résonnant entre 1,20 et 1,43 ppm et aux groupes méthyle CH_3 des lipides résonnant entre 0,82 et 0,94 ppm. Ces intensités, bien que fortement diminuées avec les délais *post mortem* les plus longs, demeurent détectables (Figure 150).

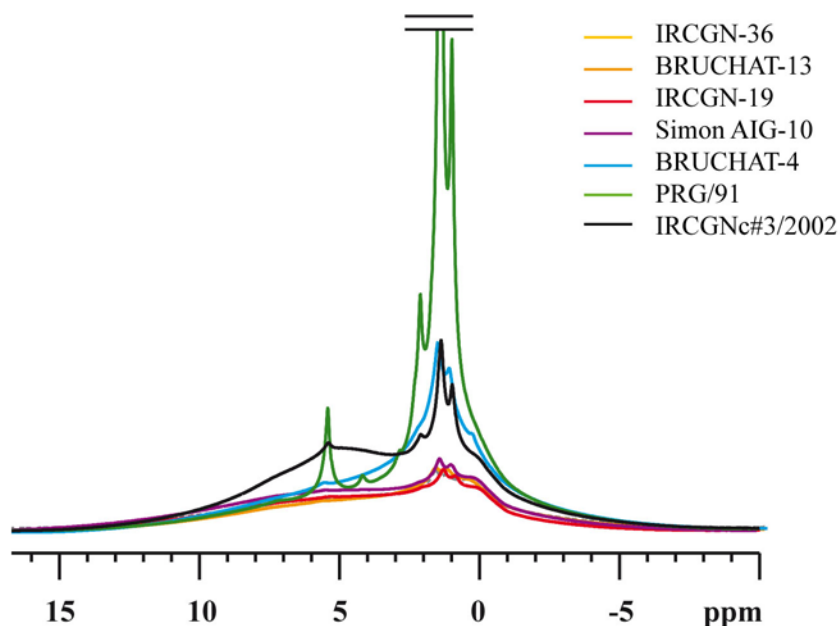


Figure 150 – Superposition des spectres RMN du proton de 7 individus présentant une transformation adipocireuse et ayant des intervalles *post mortem* compris entre 11 et 79 ans

De bas en haut : IRCGNc-#3/2002 (IPM = 11 ans) ; PRG/91 (IPM = 22 ans) ; BRUCHAT-4 (IPM = 50 ans) ; Simon AIG-10 (IPM = 59 ans) ; IRCGN-19 (IPM = 72 ans) ; BRUCHAT-13 (IPM = 71 ans) ; IRCGN-36 (IPM = 79 ans).

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; masse sèche (IRCGNc-#3/2002) = 128,3 mg ; masse sèche (PRG/91) = 118,6 mg ; masse sèche (BRUCHAT-4) = 108,0 mg ; masse sèche (Simon AIG-10) = 90,4 mg ; masse sèche (IRCGN-19) = 147,9 mg ; masse sèche (BRUCHAT-13) = 139,9 mg ; masse sèche (IRCGN-36) = 134,8 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

La superposition des spectres met en évidence de façon plus nette la persistance des signaux des groupes méthyle et méthylène sur ces échantillons contaminés.

La variation de l'aire obtenue en RMN du proton est présentée dans la Figure 151.

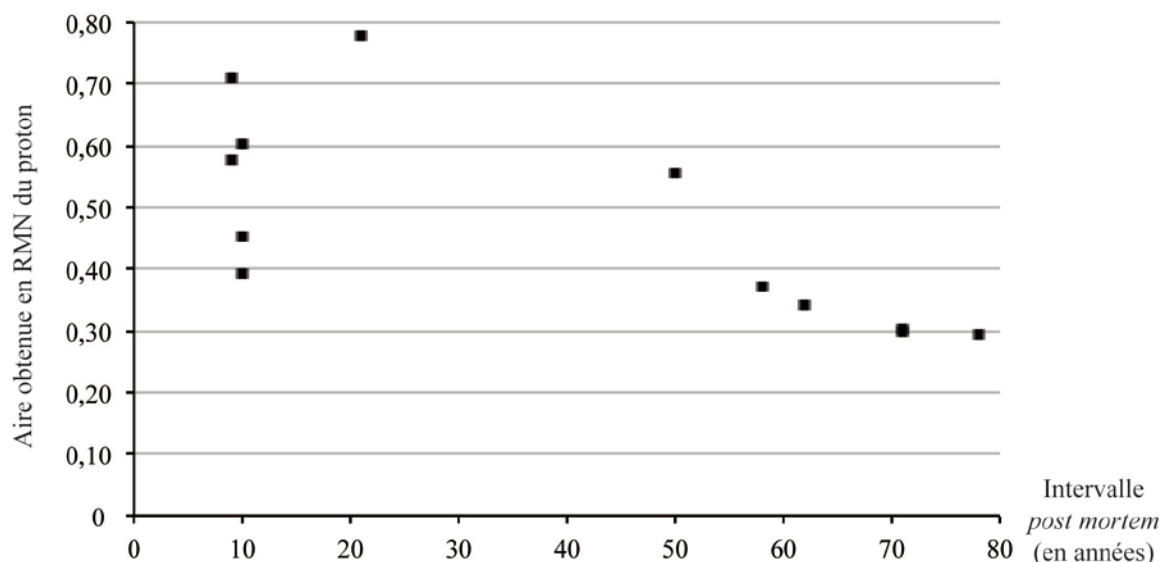


Figure 151 – Représentation graphique de l'aire mesurée en RMN du proton de tous les individus altérés de notre collection globale ($n = 12$) pour lesquels nous possédons un fémur en fonction de l'intervalle *post mortem*

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 5 ; la barre d'erreur représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$ est contenue dans le symbole.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Nous pouvons observer une augmentation de l'aire spectrale générale en RMN du proton dans les 20-30 premières années suivant le décès puis ce signal diminue. Cependant, nous n'avons pas essayé de modéliser ce comportement par une équation comme celle utilisée pour l'hydroxyapatite en RMN du proton (équation [14]) car le nombre de points est insuffisant. L'augmentation du signal observée ne correspond pas à un enrichissement de l'échantillon en lipides mais plutôt à une modification qualitative des lipides initialement présents. En effet, au cours de leur dégradation, les lipides subissent des phénomènes d'hydrogénation et d'hydrolyse entraînant, par exemple, une saturation des lipides insaturés c'est-à-dire une transformation des groupes méthine $\text{CH}=\text{CH}$ en groupes méthylène CH_2-CH_2 avec comme conséquence une augmentation du nombre de protons.

1.3.3. Synthèse des observations de notre collection d'individus altérés

Les individus présentant une transformation adipocireuse montrent une persistance du signal lipidique au cours du temps. À la suite de la formation d'adipocire, les teneurs en lipides saturés augmentent avant de subir une dégradation et une élimination. De ce fait, on peut les détecter plus longtemps. La présence même d'adipocire est un signe que le décès n'est pas récent (moins de 10 ans pour notre collection) ni trop ancien (aucun de nos échantillons d'intérêt archéologique n'est altéré).

1.4. SYNTHESE SUR L'INFLUENCE DE L'INTERVALLE POST MORTEM

Nous avons pu voir que les aires et intensités spectrales obtenues en RMN du proton et du carbone-13 étaient influencées par le délai *post mortem* de l'échantillon. Cependant, il existe une grande variabilité dans les mesures qui ne nous autorise pas à établir un modèle prédictif simple à partir d'un seul indicateur pour estimer l'intervalle *post mortem*. Nous avons néanmoins vu que certaines aires et intensités évoluaient plus ou moins rapidement avec le temps.

D'une manière générale, le ratio ALICO nous donne une indication sur la présence de dégradation ou d'altération de l'échantillon qui indique dans un cas son ancienneté (domaine archéologique avéré) et dans l'autre cas un délai *post mortem* relativement récent.

2. INFLUENCE DES CONDITIONS DE CONSERVATION

2.1. ANALYSE SUR NOTRE COLLECTION GLOBALE

Comme nous l'avons déjà évoqué au cours de ce travail, les individus que nous étudions proviennent de différentes collections qui présentent elles-mêmes différentes conditions de conservation. Pour les 97 individus pour lesquels nous avons étudié un fémur, cinq milieux de conservation différents existent :

- L'inhumation directement en pleine terre ;
- L'inhumation dans un cercueil lui même enterré en pleine terre ;
- L'inhumation dans un cercueil qui repose dans un caveau ;
- La découverte du corps dans de l'eau douce ;
- Et la conservation du corps dans les instituts médico-légaux (y compris les laboratoires d'anatomie).

Les individus étudiés proviennent de notre collection globale c'est-à-dire que les sujets présentant une altération secondaire à une transformation adipocireuse sont pris en compte. Nous avons fait le choix de ne pas les exclure car la formation d'adipocire dépend en grande partie de l'environnement dans lequel repose le sujet (*e.g.* humidité, température) et donc des conditions de conservation (Forbes *et al.* 2005b ; Pinheiro 2006). Exclure ces individus biaiserait donc l'analyse.

Nous avons représenté les variations des aires spectrales obtenues en RMN du carbone-13 dans la Figure 152 pour les chaînes aliphatiques et dans la Figure 153 pour les groupes carboxyle, et obtenue en RMN du proton dans la Figure 154.

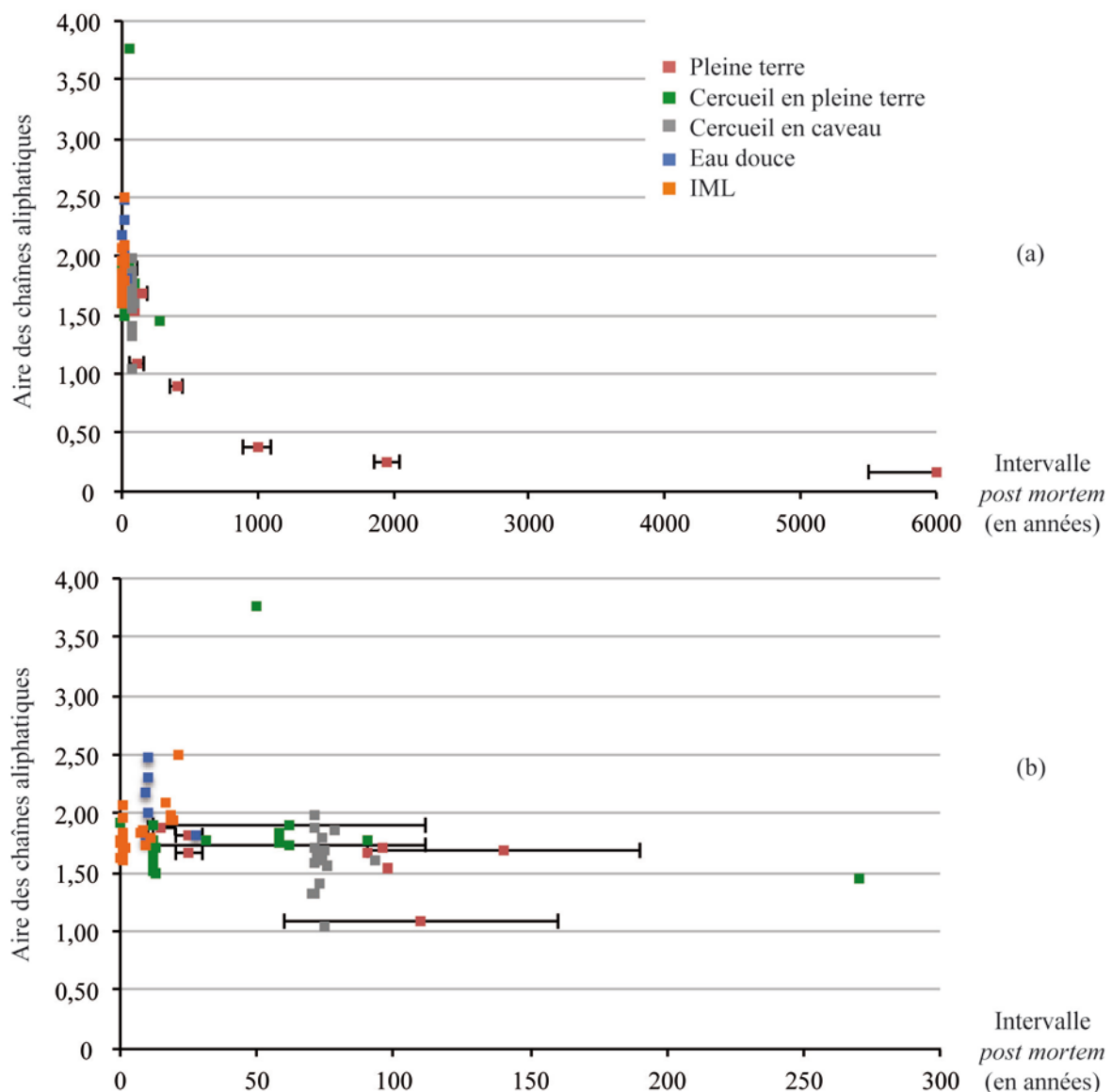


Figure 152 – Représentation graphique de l'aire des chaînes aliphatiques des individus de notre collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle *post mortem*

(a) pour tous les individus de la collection ($n = 97$) ; (b) pour les individus dont l'intervalle *post mortem* est inférieur à 300 ans ($n = 93$)

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 6 ; la barre d'erreur verticale représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7\%$ est contenue dans le symbole ; la barre d'erreur horizontale représente l'intervalle de confiance de l'estimation du délai *post mortem* lorsque la date de décès de l'individu n'est pas connue avec précision.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Pour les temps longs nous notons que les inhumations en pleine terre suivent la décroissance exponentielle déjà évoquée. Aux temps courts c'est-à-dire inférieurs à 300 ans, nous constatons qu'il est difficile de discerner des différences nettes entre les différents milieux de conservation. En effet, du fait de l'hétérogénéité de notre collection globale, il apparaît que pour chaque milieu de conservation, les individus présentent des délais *post mortem* proches. Ainsi, les individus conservés dans les instituts médico-légaux sont tous datés des 20 dernières années ; ceux

inhumés dans des cercueils en caveau sont datés d'environ 70 ans et ceux retrouvés en eau douce d'une dizaine d'années. Seuls les sujets inhumés en pleine terre ou dans des cercueils en pleine terre présentent des délais *post mortem* étalés sur plusieurs centaines d'années. Nous constatons, néanmoins, qu'aucun groupe ne se distingue des autres. Seul un individu (BRUCHAT-4) sort de la variabilité des autres sujets et il s'agit d'un individu qui présente une altération forte avec un ration ALICO de 5,01 ce qui est très important.

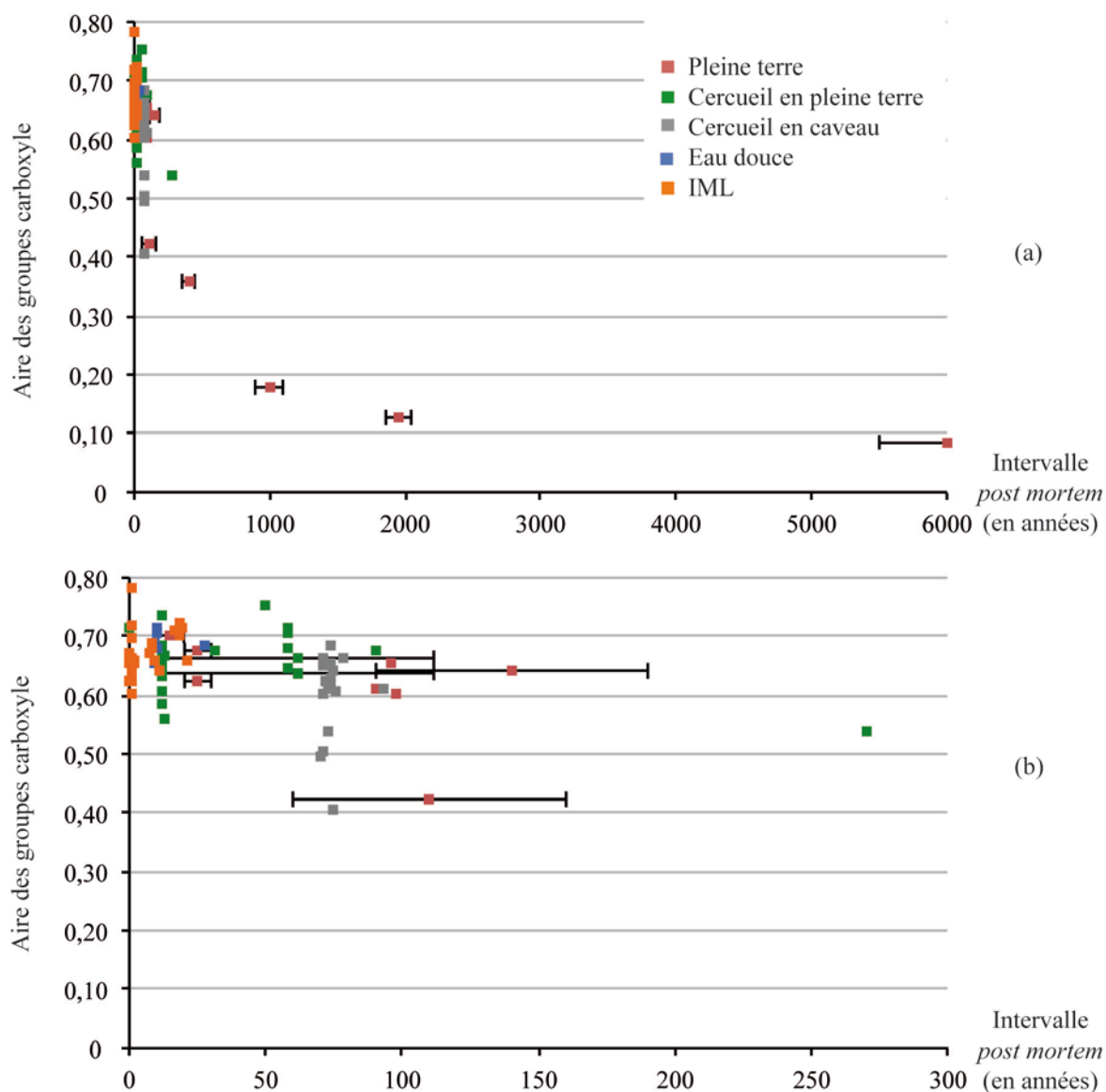


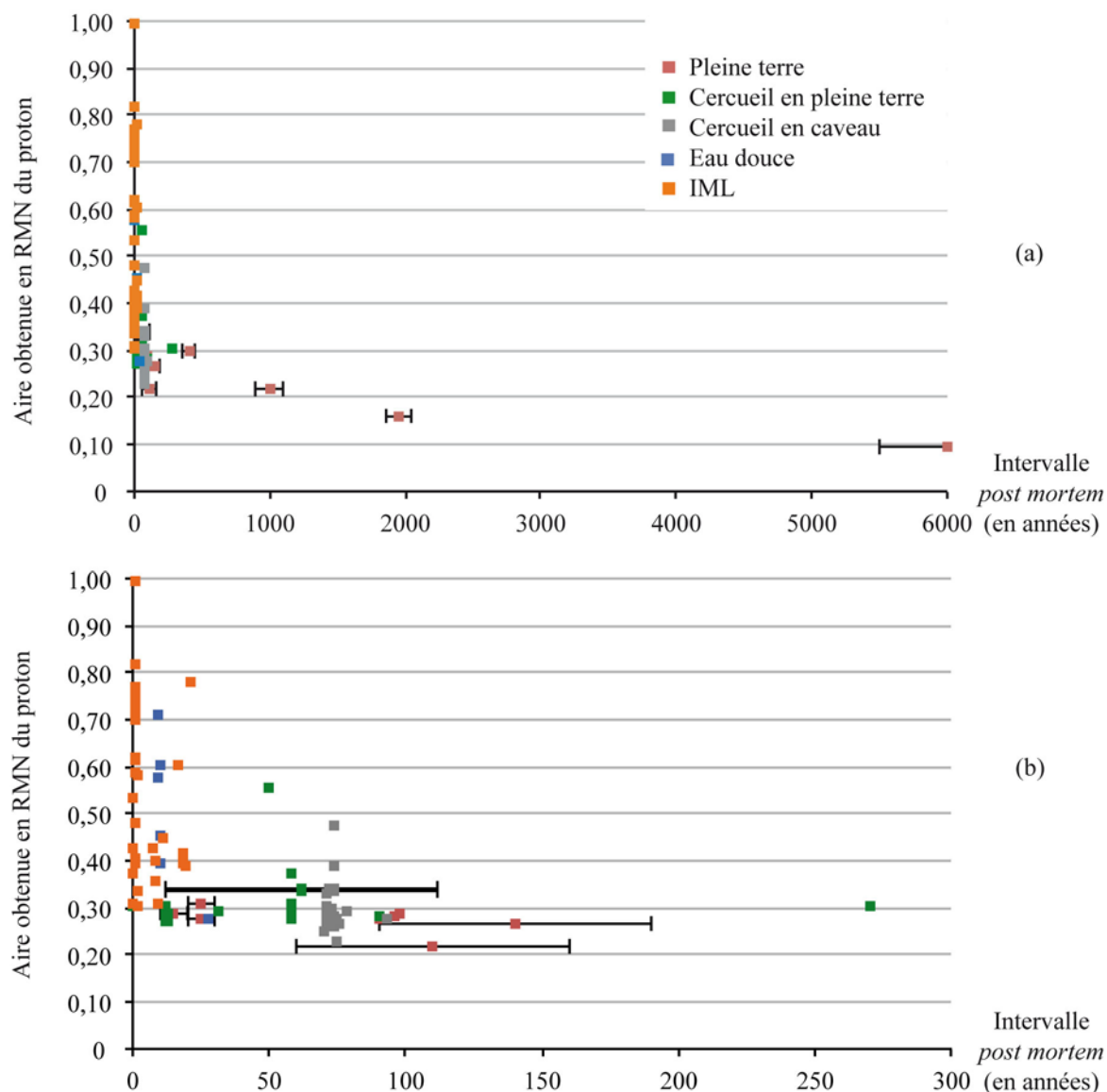
Figure 153 – Représentation graphique de l'aire des groupes carboxyle des individus de notre collection globale pour lesquels nous possédons un fémur, en RMN du carbone-13 en fonction de l'intervalle *post mortem*

(a) pour tous les individus de la collection ($n = 97$) ; (b) pour les individus dont l'intervalle *post mortem* est inférieur à 300 ans ($n = 93$)

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg ; les masses initiales sont données en Annexe 6 ; la barre d'erreur verticale représentant un intervalle de confiance à $\pm 1,7 \%$ est contenue dans le symbole ; la barre d'erreur horizontale représente l'intervalle de confiance de l'estimation du délai *post mortem* lorsque la date de décès de l'individu n'est pas connue avec précision.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5 \text{ s}$; $P_1 = 2,85 \mu\text{s}$; $\tau_c = 1,5 \text{ ms}$; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Avec les aires des groupes carboxyle, nous notons la même absence de différence nette entre les différents milieux de conservation. Il apparaît toutefois qu'aucun sujet (y compris chez ceux présentant une altération) ne sort de la variabilité. Cela renforce le fait que les groupes carboxyle ne sont pas influencés par la transformation adipocireuse.



L'aire mesurée en RMN du proton, composée des signaux des lipides, du collagène et de l'hydroxyapatite, présente une grande variabilité pour les intervalles *post mortem* les plus courts ; puis, cette variabilité diminue avec le temps. Ici aussi, il est très difficile de corrélérer cette variabilité uniquement aux conditions de conservation puisque nous avons vu lors de l'analyse de l'influence des facteurs âge et sexe (cf. partie 5, chapitre 5.3, page 231) que le sexe des sujets influençait les aires spectrales mesurées en RMN du proton au sein de la collection BRUULB qui présente des délais *post mortem* de un an. La variabilité que nous observons ici pour les temps courts est donc peut-être attribuable au sexe des sujets plus qu'à leurs conditions de conservation.

L'analyse des conditions de conservation n'apporte pas de résultat pertinent, hormis pour les inhumations en pleine terre observées sur plusieurs centaines d'années. Plusieurs raisons ou hypothèses peuvent expliquer ceci : tout d'abord, cela peut refléter une absence réelle d'influence des conditions de conservation sur les aires spectrales que nous avons mesurées en RMN du carbone-13 et du proton ; cependant, il semblerait plus probable que la raison soit l'hétérogénéité de notre collection globale que ce soit en termes d'intervalles *post mortem* représentés ou d'effectif par classe de condition de conservation. En raison de ces limites interprétatives, nous avons décidé d'analyser des os de faune (*Sus scrofa*) pour lesquels les conditions de conservation étaient connues.

2.2. ANALYSE DES ECHANTILLONS EXPERIMENTAUX D'OS DE FAUNE

Les échantillons expérimentaux sont des sections de fémurs de cochon domestique (*Sus scrofa*) obtenues après décharnement. Ces os ont été placés dans différents milieux de conservation et analysés à différents délais *post mortem*. Ainsi nous avons réalisé les spectres RMN du proton et du carbone-13 d'un échantillon frais (VAL12-11-22) ; d'échantillons inhumés en pleine terre (analysés à un an pour l'échantillon SAterre12 et à deux ans pour SAterre13) ; d'échantillons déposés à l'air libre pour lesquels nous avons distingué la face supérieure (analysés à un an pour SAairair12 et à deux ans pour SAairair13) et la face au contact du sol (analysés à un an pour SAairsol12 et à deux ans pour SAairsol13).

Ces différents échantillons vont nous permettre d'évaluer sur des délais *post mortem* allant jusqu'à deux ans les variations de constitution du tissu osseux en fonction des conditions de conservation que nous avons établies.

2.2.1. Analyse en RMN du carbone-13

Les spectres RMN du carbone-13 obtenus pour les échantillons de *Sus scrofa* datés de un an ont été comparés au spectre obtenu sur un os frais. Les spectres de ces quatre échantillons sont présentés dans la Figure 155 et leur superposition dans la Figure 156.

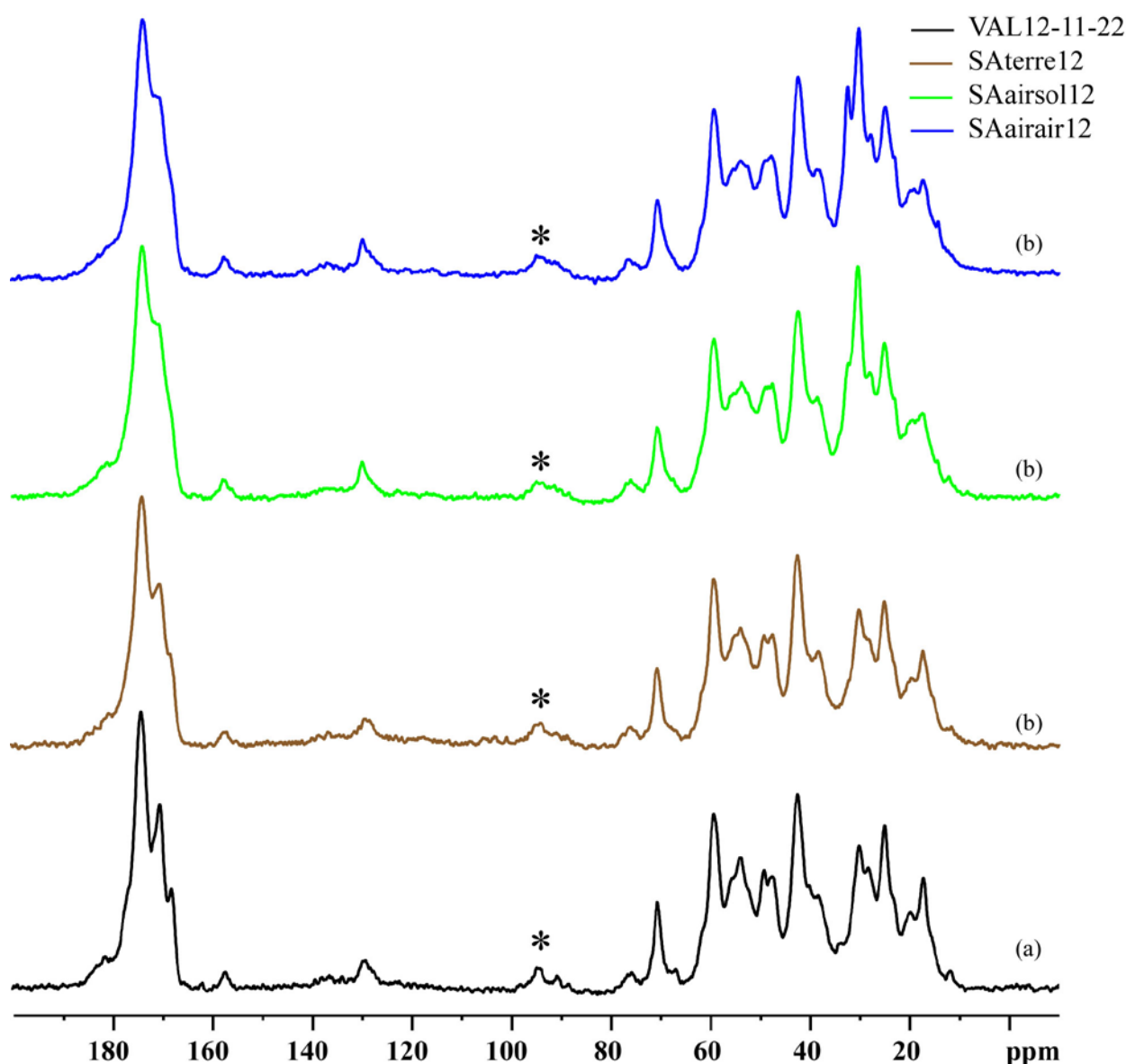


Figure 155 – Spectres RMN du carbone-13 d'échantillons expérimentaux de *Sus scrofa* présentant différentes conditions de conservation et un intervalle *post mortem* de 1 an

(a) Os frais ; (b) Intervalle *post mortem* de 1 an

* : bande de rotation.

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg.

Masse initiale (VAL12-11-22) = 125,2 mg ; masse initiale (SAterre12) = 114,7 mg ; masse initiale (SAairair12) = 138,4 mg ; masse initiale (SAairsol12) = 135,6 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Nous constatons que les profils spectraux diffèrent entre ces quatre échantillons. L'échantillon d'os frais (VAL12-11-22) apparaît mieux résolu que les autres échantillons notamment dans la zone des groupes carboxyle (170-185 ppm). Ensuite, nous pouvons voir apparaître des différences spectrales au niveau de la zone des chaînes aliphatiques pour les échantillons laissés à l'air libre (SAairair12 et SAairsol12). Ils présentent un pic surnuméraire vers 33 ppm associé à une augmentation d'intensité du pic vers 30 ppm. Ces différences sont plus facilement identifiables sur la superposition des spectres (Figure 156).

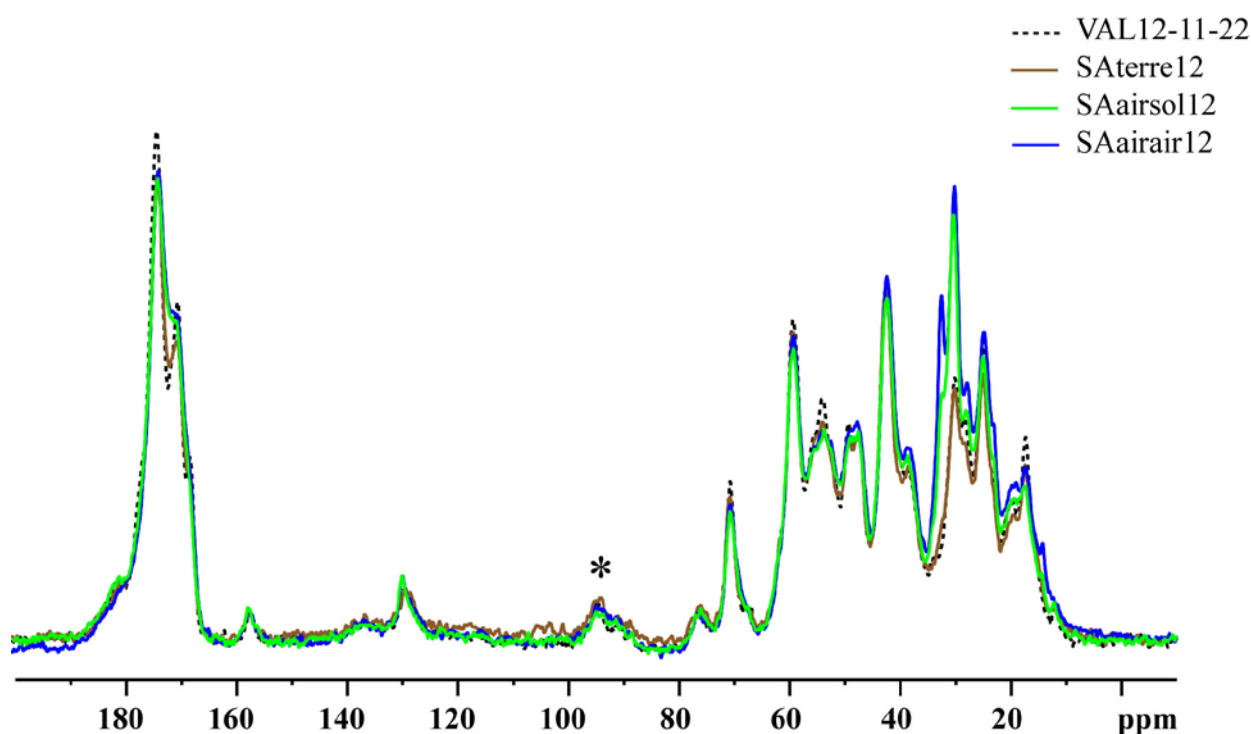


Figure 156 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 d'échantillons expérimentaux de *Sus scrofa* présentant différentes conditions de conservation et un intervalle *post mortem* de 1 an

* : bande de rotation.

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg.

Masse initiale (VAL12-11-22) = 125,2 mg ; masse initiale (SAterre12) = 114,7 mg ; masse initiale (SAairair12) = 138,4 mg ; masse initiale (SAairsol12) = 135,6 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

La présence des pics à 30 et 33 ppm retrouvés sur les échantillons laissés à l'air libre nous informe que ces os sont altérés par le processus de transformation adipocireuse. Le ratio ALICO nous le confirme : en effet, SAairair12 présente un ratio de 2,97 et SAairsol12 un ratio de 2,86 lesquels sont situés en dehors de l'intervalle de confiance [2,52-2,75] défini sur notre échantillon global (os de différente nature provenant de nos échantillons humains et de faune).

Nous avons réalisé la même analyse sur les échantillons datés de deux ans. Les spectres sont représentés dans la Figure 157 et leur superposition dans la Figure 158.

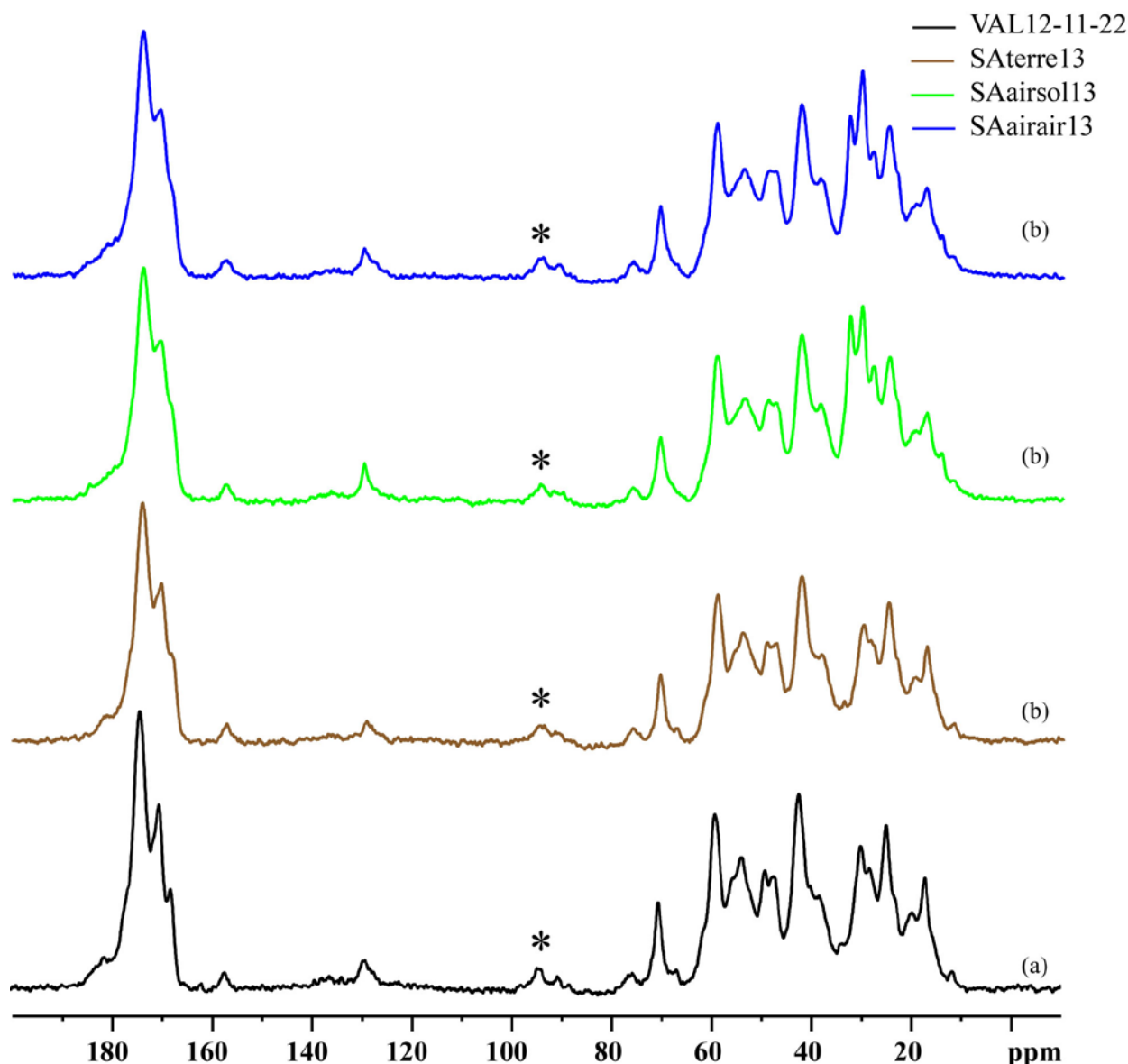


Figure 157 – Spectres RMN du carbone-13 d'échantillons expérimentaux de *Sus scrofa* présentant différentes conditions de conservation et un intervalle *post mortem* de 2 ans

(a) Os frais ; (b) Intervalle *post mortem* de 2 ans

* : bande de rotation.

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg.

Masse initiale (VAL12-11-22) = 125,2 mg ; masse initiale (SAterre13) = 132,9 mg ; masse initiale (SAairair13) = 140,4 mg ; masse initiale (SAairsol13) = 157,6 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Comme pour les os datés de un an, nous constatons que l'os frais présente une meilleure résolution spectrale, essentiellement dans la zone des groupes carboxyle. L'os enterré (SAterre13) présente un profil spectral non altéré contrairement aux os laissés à l'air libre

(SAairsol13 et SAairair13). La superposition des spectres nous confirme ces résultats (Figure 158).

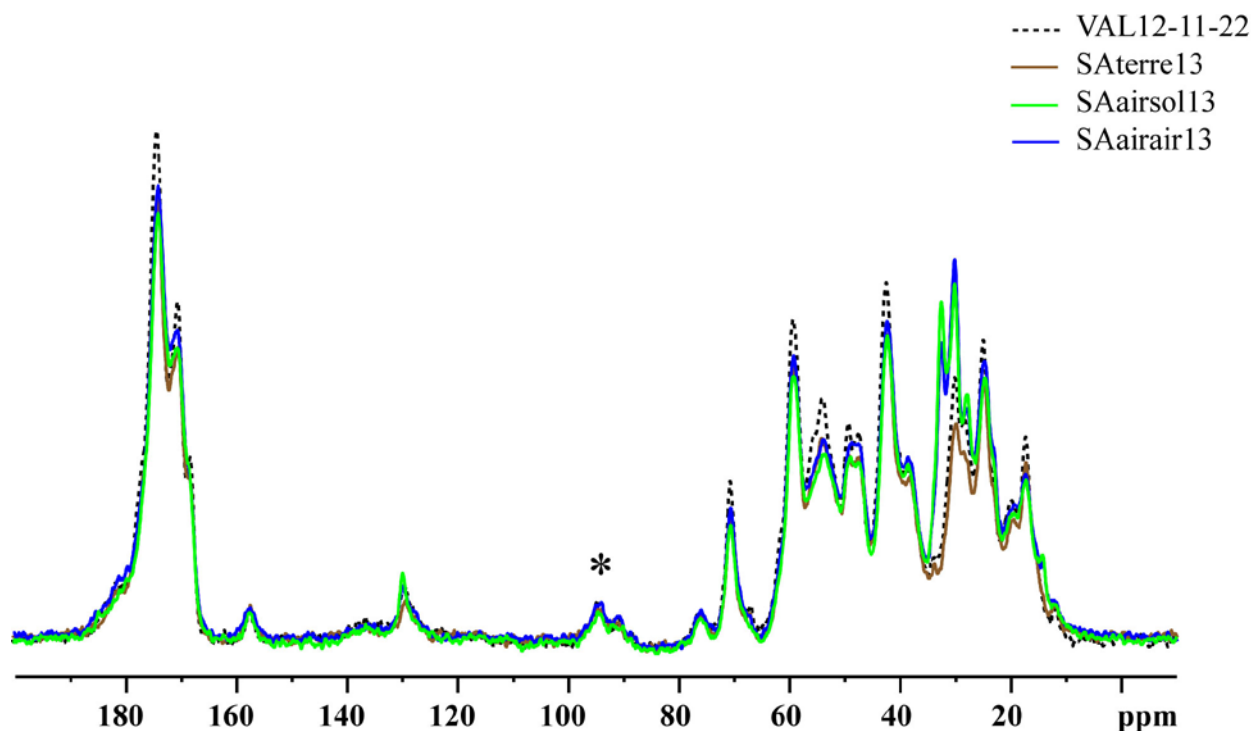


Figure 158 – Superposition des spectres RMN du carbone-13 d'échantillons expérimentaux de *Sus scrofa* présentant différentes conditions de conservation et un intervalle *post mortem* de 2 ans

* : bande de rotation.

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg. Masse initiale (VAL12-11-22) = 125,2 mg ; masse initiale (SAterre13) = 132,9 mg ; masse initiale (SAairair13) = 140,4 mg ; masse initiale (SAairsol13) = 157,6 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

L'altération due à la transformation adipocireuse est toujours présente sur nos deux échantillons laissés à l'air libre. L'os enterré présente un pic surnuméraire peu intense vers 33 ppm attestant d'une légère altération adipocireuse.

Nous allons maintenant voir si ces différences sont aussi décelables sur les spectres obtenus en RMN du proton.

2.2.2. Analyse en RMN du proton

Nous avons représenté dans la Figure 159 les spectres obtenus en RMN du proton de notre échantillon frais ainsi que des échantillons laissés à l'air libre et enterré ayant un délai *post mortem* de un an. La superposition de ces spectres est présentée dans la Figure 160.

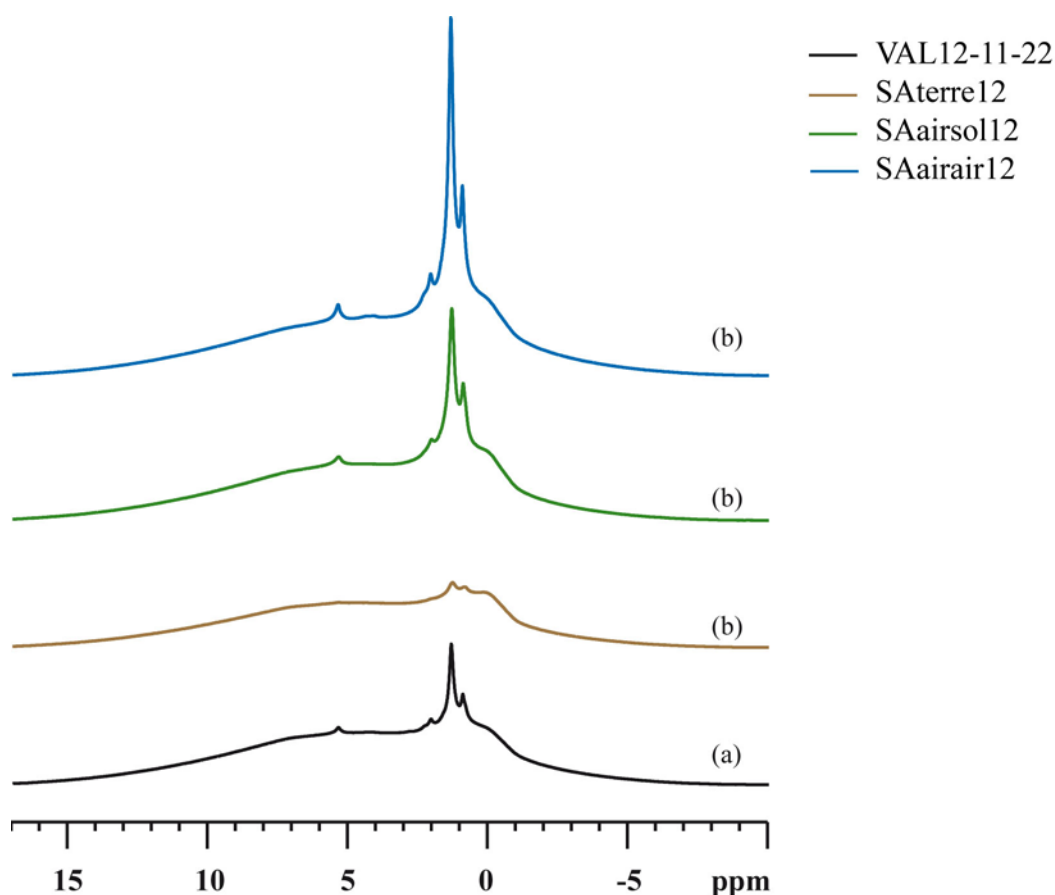


Figure 159 – Spectres RMN du proton d'échantillons expérimentaux de *Sus scrofa* présentant différentes conditions de conservation et un intervalle *post mortem* de 1 an

(a) Os frais ; (b) Intervalle *post mortem* de 1 an

* : bande de rotation.

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg.

Masse sèche (VAL12-11-22) = 130,3 mg ; masse sèche (SAterre12) = 109,9 mg ; masse sèche (SAairair12) = 113,7 mg ; masse sèche (SAairsol12) = 128,8 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Nous constatons que le signal est moins bien résolu pour l'échantillon enterré (SAterre12) essentiellement au niveau des pics de résonance des lipides qui apparaissent beaucoup moins intenses. Les échantillons laissés à l'air libre présentent en revanche des signaux lipidiques de leurs chaînes des acides gras plus intenses (pics de résonance des groupes méthylène $(CH_2)_n$ et des groupes méthyle CH_3 résonnant respectivement entre 1,20 et 1,43 ppm et entre 0,82 et 0,94 ppm). La superposition des spectres (Figure 160) confirme ces observations.

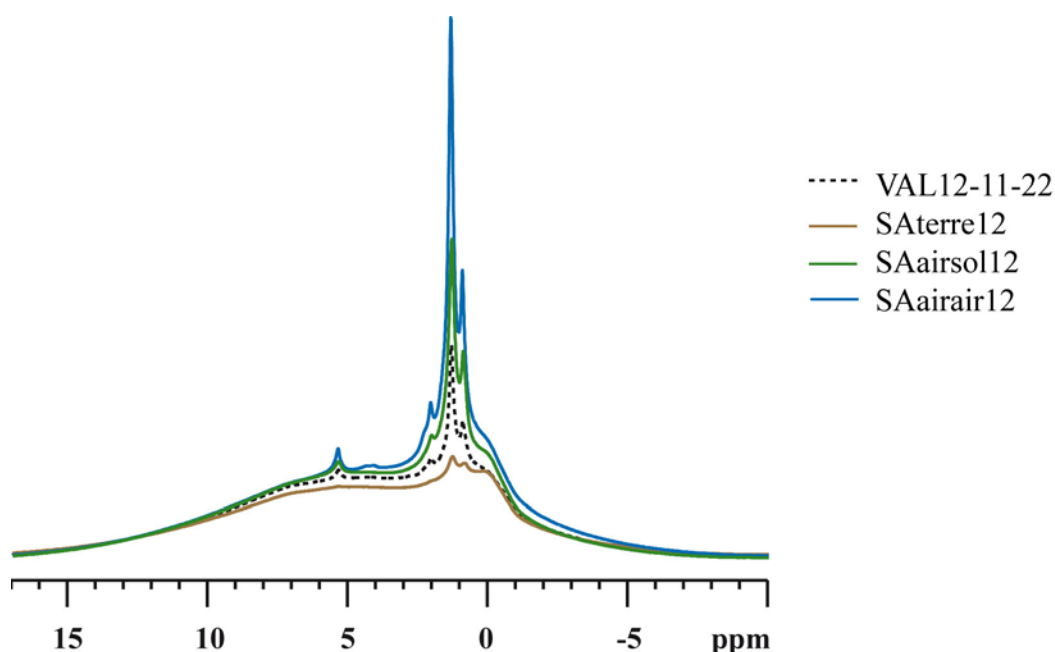


Figure 160 – Superposition des spectres RMN du proton d'échantillons expérimentaux de *Sus scrofa* présentant différentes conditions de conservation et un intervalle *post mortem* de 1 an

* : bande de rotation.

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg.

Masse sèche (VAL12-11-22) = 130,3 mg ; masse sèche (SAterre12) = 109,9 mg ; masse sèche (SAairair12) = 113,7 mg ; masse sèche (SAairsol12) = 128,8 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Nous avons réalisé la même analyse pour des os ayant un délai *post mortem* de deux ans. Les spectres et leur superposition sont présentés dans la Figure 161 et dans la Figure 162 respectivement.

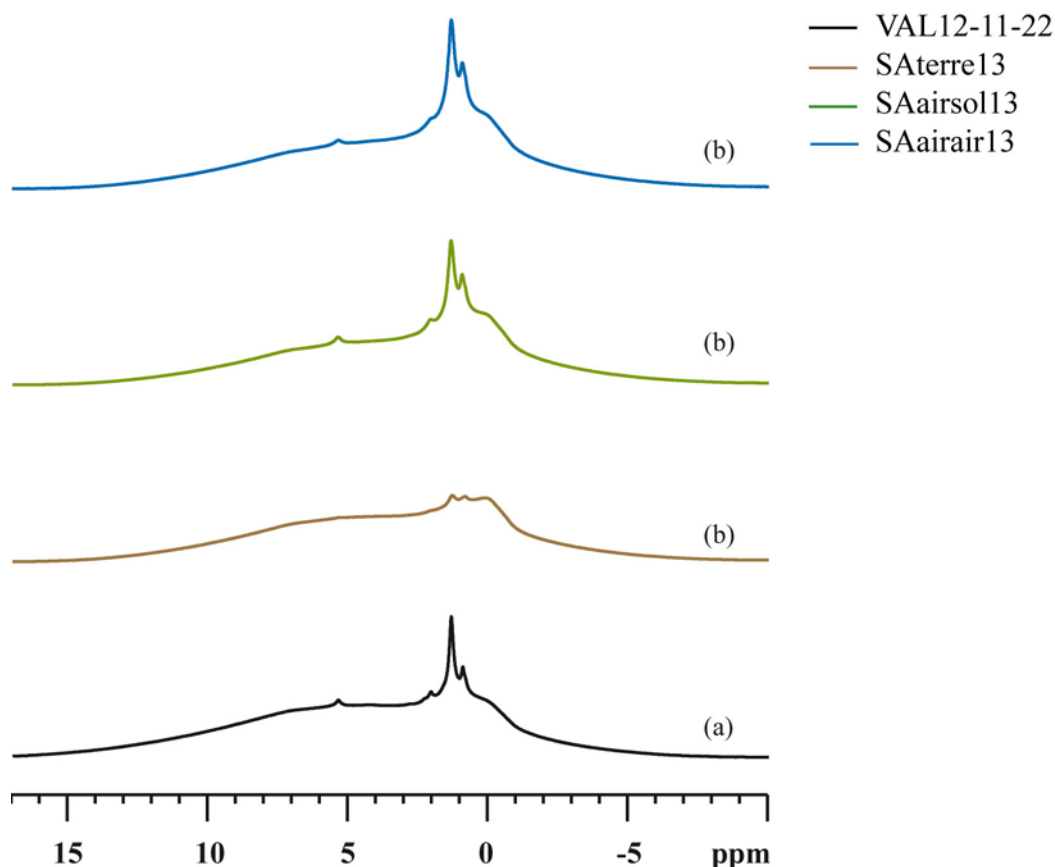


Figure 161 – Spectres RMN du proton d'échantillons expérimentaux de *Sus scrofa* présentant différentes conditions de conservation et un intervalle *post mortem* de 2 ans

(a) Os frais ; (b) Intervalle *post mortem* de 2 ans

* : bande de rotation.

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg.

Masse sèche (VAL12-11-22) = 130,3 mg ; masse sèche (SAterre13) = 130,8 mg ; masse sèche (SAairair13) = 143,6 mg ; masse sèche (SAairsol13) = 150,6 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Nous observons ici aussi que l'échantillon enterré présente un signal moins bien résolu et moins intense. En revanche, l'augmentation du signal sur les os à l'air libre apparaît moins prononcée.

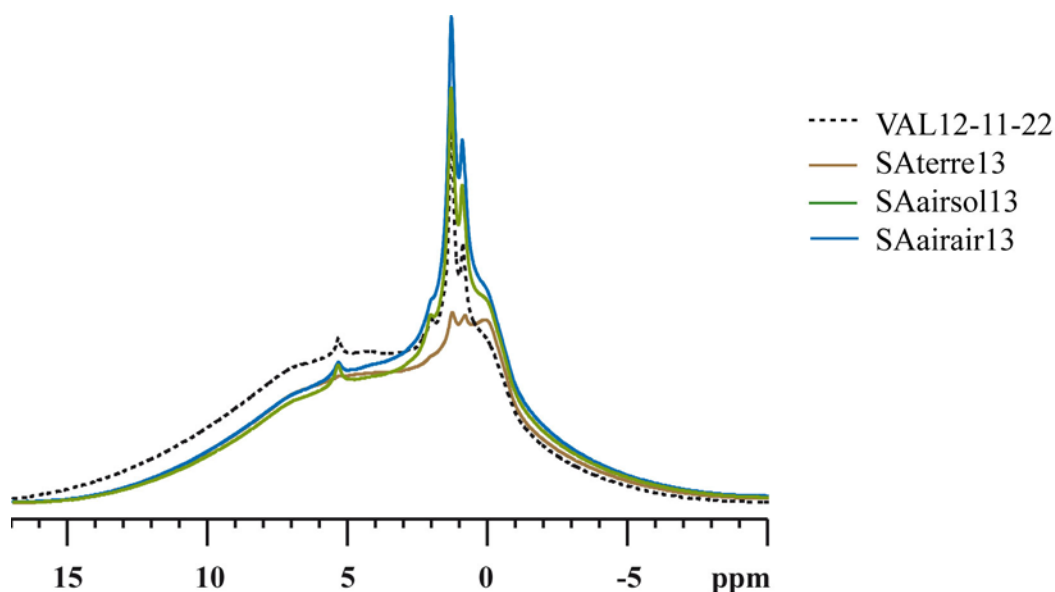


Figure 162 – Superposition des spectres RMN du proton d'échantillons expérimentaux de *Sus scrofa* présentant différentes conditions de conservation et un intervalle *post mortem* de 2 ans

* : bande de rotation.

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche équivalente de 100 mg.

Masse sèche (VAL12-11-22) = 130,3 mg ; masse sèche (SAterre13) = 130,8 mg ; masse sèche (SAairair13) = 143,6 mg ; masse sèche (SAairsol13) = 150,6 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

La comparaison des spectres nous montre que les signaux lipidiques des os laissés à l'air libre demeurent supérieurs à ceux de l'os frais et de l'os enterré.

2.2.3. Synthèse des observations sur nos échantillons expérimentaux

L'analyse de nos échantillons expérimentaux met en évidence un comportement différent du tissu osseux en fonction du délai *post mortem* et ceci dès une année après le décès. Il faut considérer ces résultats avec précautions car les os analysés sont des sections d'os décharnés. Les actions de dégradation du tissu osseux sont donc potentiellement modifiées par ce traitement préalable de l'os. Cependant, il semblerait que l'inhumation en pleine terre entraîne une dégradation plus rapide du tissu osseux que ce soit au niveau de sa matière collagénique (mise en évidence sur les spectres en RMN du carbone-13) ou lipidique (spectres en RMN du proton). En revanche, le dépôt de l'os à l'air libre entraîne l'apparition d'une transformation adipocireuse détectable dès la première année suivant le décès.

Ces observations se retrouvent lorsque nous quantifions les aires spectrales obtenues en RMN du carbone-13 et du proton ainsi que lorsque nous considérons l'intensité du pic des groupes méthylène des lipides (résonnant entre 1,20 et 1,43 ppm) qui est caractéristique des chaînes des acides gras des lipides (Tableau 47).

Tableau 47 – Variation des aires spectrales obtenues en RMN du carbone 13 et du proton, et variation de l'intensité du pic attribuable aux groupes méthylène CH₂ des lipides en RMN du proton d'échantillons expérimentaux de Sus scrofa en fonction des conditions de conservation et de l'intervalle post mortem

Conditions de conservation	Intervalle <i>post mortem</i> (en années)	RMN du carbone-13			RMN du proton	
		Chaînes aliphatiques	Groupes carboxyle	Ratio ALICO	Aire	Intensité des (CH ₂) _n ^a
Frais	0	1,56	0,58	2,69	0,33	56 073
Pleine terre	1	1,45	0,54	2,68	0,28	25 305
	2	1,35	0,52	2,60	0,28	25 256
Air libre (surface supérieure)	1	1,84	0,62	2,97	0,43	145 308
	2	1,90	0,66	2,88	0,33	67 063
Air libre (surface inférieure)	1	1,69	0,59	2,86	0,37	85 427
	2	1,57	0,53	2,96	0,32	57 301

^a Le pic de résonance des groupes méthylène (CH₂)_n des lipides résonne entre 1,20 et 1,43 ppm ; Les données brutes sont fournies en Annexes 8, 9 et 10 ; l'intervalle de confiance à 95 % du ratio ALICO est déterminé à partir de sa moyenne (2,63) et de son écart-type (0,06) c'est-à-dire l'intervalle [2,51-2,75].

L'analyse des aires spectrales confirme ce que nous avons observé au niveau des spectres.

En pleine terre, les aires des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle sont diminuées par rapport à celles d'un os frais que ce soit au bout de un ou deux ans. En revanche, le ratio ALICO reste dans l'intervalle de confiance ce qui confirme l'absence d'altération des os enterrés (altération mineure au bout de 2 ans). En RMN du proton, nous observons une diminution de l'aire spectrale mais aussi du pic de résonance des groupes méthylène CH₂ des lipides. Ces deux éléments nous indiquent une diminution de la quantité de lipides mais aussi du collagène.

Pour les os laissés à l'air libre, les aires des chaînes aliphatiques obtenues en RMN du carbone-13 sont supérieures à celle de l'os frais. Elles le sont aussi pour les groupes carboxyle des os dont la face supérieure a été analysée (SAairair12 et SAairair13) mais cette différence n'est plus observée pour la partie de l'os au contact du sol (SAairsol12). Cela se traduit par un ratio ALICO augmenté (entre 2,86 et 2,97) sortant nettement de l'intervalle de confiance et indiquant une altération par transformation adipocireuse. En RMN du proton, nous observons des résultats cette fois différents en fonction de l'intervalle *post mortem*. Ainsi, un an après le dépôt à l'air libre, les aires spectrales sont augmentées que ce soit au niveau de la face supérieure ou inférieure de l'os. Nous constatons que ces os présentent aussi une altération due à une transformation adipocireuse, une des hypothèses pouvant expliquer l'augmentation du signal

provient alors de l'infiltration au sein de la trame osseuse d'adipocire en lieu et place d'autres molécules ou composés (*e.g.* eau, cellules ou collagène) En revanche, deux ans après le décès, les aires spectrales présentent des valeurs similaires à celles retrouvées sur os frais ce qui indique qu'il y a eu effectivement une perte de la fraction lipidique entre un et deux ans de délai *post mortem*.

Tous ces résultats sont à interpréter avec précaution : d'une part, à cause du traitement initial de l'os avant expérimentation (section et décharnement) (Hedges 2002) et, d'autre part, à cause du faible effectif analysé (un seul échantillon par condition de conservation et par délai *post mortem*).

SIXIEME PARTIE

Synthèse et discussion

Dans cette sixième et dernière partie, nous réaliserons une synthèse et une discussion générale de ce travail de thèse. Nous reviendrons sur les principaux points clé développés dans ce travail qui sont, d'une part, l'aspect purement méthodologique des acquisitions en spectroscopie de RMN, et, d'autre part, les propositions d'interprétations spectrales au regard de la préservation qualitative des échantillons en fonction de leur milieu de conservation, des variations intra et inter-individuelles des constituants du tissu osseux déterminées sur les spectres en RMN du carbone-13 et du proton, et de l'influence du délai *post mortem* sur ces mêmes constituants.

1. VALIDATION DU PROTOCOLE D'ETUDE DU TISSU OSSEUX PAR SPECTROSCOPIE DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DES SOLIDES, EN ROTATION A L'ANGLE MAGIQUE (MAS)

Du vivant de l'individu, le tissu osseux est un tissu dynamique composé de deux fractions principales organique et minérale, et d'eau. La fraction organique est essentiellement composée de fibres de collagène minéralisées et de lipides alors que la fraction minérale se compose de bio-hydroxyapatite. L'analyse de ces différents constituants par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire requiert alors l'utilisation des atomes de carbone, phosphore et d'hydrogène. Nous n'avons trouvé aucune référence bibliographique qui répertoriait l'ensemble des déplacements chimiques de ces constituants en RMN des solides du carbone-13, du phosphore-31 et de l'hydrogène ou proton. Nous avons donc réalisé une synthèse des données issues de la littérature, constituant par constituant et atome par atome.

Ainsi les analyses en RMN du carbone-13 nous ont permis de faire l'attribution des pics de résonance pour les chaînes aliphatiques des principaux acides aminés qui constituent le collagène de type I (glycine, alanine, proline, hydroxyproline mais aussi arginine, acide glutamique et acides aminés aromatiques), et l'attribution de leurs groupes carbonyle et carboxyle (Saito *et al.* 1984 ; Fujisawa et Kuboki 1990 ; Zhu *et al.* 2009). Nous avons également identifié les fréquences de résonance des groupes méthine CH=CH et des groupes méthylène CH₂ des acides gras des lipides (Soubias *et al.* 2004 ; Grélard *et al.* 2009) ainsi que la fréquence de résonance du citrate osseux (Fischer *et al.* 1995 ; Hu *et al.* 2010). Ces différents composés sont tous des constituants de la matière organique. Malheureusement, la fraction minérale si elle se compose d'hydroxyapatite pure ne contient pas d'atome de carbone et n'est donc pas identifiable sur les spectres RMN. Concernant ses formes biologiques, substituées, seuls les carbonates seraient détectables et leurs fréquences de résonance est identique à celles de groupes carbonyle et

carboxyle des acides aminés (Papenguth *et al.* 1989). **En RMN du carbone-13, l'essentiel du signal provient donc des acides aminés du collagène de type I.**

Les analyses en **RMN du proton** sont perturbées par le signal dominant de l'eau H₂O qui est très important. Les analyses doivent donc être menées après lyophilisation des échantillons. Ainsi, on a pu faire l'attribution des pics de résonance des **lipides** qui se présentent sous forme de raies fines et qui représentent l'essentiel du signal sur os frais (Soubias *et al.* 2004 ; Grélard *et al.* 2009). Le signal provenant du **collagène** est aussi détectable mais de façon moins nette ce qui ne nous autorise pas à réaliser l'attribution individuelle des acides aminés (Bundi et Wüthrich 1979). Enfin, nous retrouvons le signal du groupe hydroxyle OH de l'**hydroxyapatite** (Cho *et al.* 2003 ; Jaeger *et al.* 2005 ; Wilson *et al.* 2006).

Malheureusement, en **RMN du phosphore-31**, nous n'avons pas obtenu de résultat pertinent pour identifier les différents groupes de phosphate contenus dans le tissu osseux. Le signal observé correspond à un unique pic de résonance **peu informatif** (Roufosse *et al.* 1984 ; Kaflak-Hachulska *et al.* 2003 ; Kolodziejewski 2004 ; Kaflak *et al.* 2006). Nous avons alors décidé de ne pas réaliser d'analyses plus approfondies en RMN du phosphore-31.

Nous avons donc analysé nos échantillons en RMN du carbone-13 et RMN du proton. Pour permettre une comparaison entre les spectres, nous les avons lyophilisés et avons déterminé leur masse sèche ce qui nous a permis d'avoir des spectres comparables en termes de masses d'os analysé. Ensuite, nous avons déterminé les **paramètres d'acquisition optimaux** pour le **délai D₁ entre deux acquisitions** et le **temps de contact τ_c** permettant le transfert de magnétisation entre les atomes d'hydrogène et de carbone lors des acquisitions en RMN du carbone-13. En effet, sur les spectres RMN du carbone-13, nous identifions deux massifs distincts, celui des groupes carboxyle – dont l'atome de carbone n'est pas directement lié à un atome d'hydrogène – et celui des chaînes aliphatiques des acides aminés dont les atomes de carbone portent un à trois atomes d'hydrogène. Cette distinction chimique entre ces deux groupes nécessiterait l'utilisation de temps de contact spécifique à chaque groupe. Or, nous avons choisi de déterminer un temps de contact unique ($\tau_c = 1,5$ ms), compromis entre les deux temps de contact idéaux. Celui-ci présente une durée similaire à celle retrouvée dans la littérature (Saito et Yokoi 1992 ; Smernik et Oades 2000 ; Huster *et al.* 2002 ; Hou *et al.* 2006 ; Alfano *et al.* 2009).

Une fois les constituants du tissu osseux identifiés et les paramètres d'acquisition optimisés, nous avons réalisé les spectres en RMN du carbone-13 et du proton de tous les échantillons de notre collection globale.

2. CONTAMINATION, ALTERATION ET DEGRADATION DU TISSU OSSEUX : INFLUENCE DES CONDITIONS DE CONSERVATION SUR LE TISSU OSSEUX

Lors de nos analyses en RMN du carbone-13, nous avons constaté que certains spectres présentaient une modification de leur profil spectral qui perturbait le rapport entre l'aire des chaînes aliphatiques et celle des groupes carboxyle. Ce rapport que nous avons nommé ratio ALICO est un bon indicateur permettant de déterminer l'état de préservation d'un os. En effet, si le ratio n'est pas compris dans l'intervalle de confiance que nous avons défini [2,51-2,75], l'os présente soit une dégradation (ratio < 2,51) que l'on retrouve sur les os d'intérêt archéologique, soit une altération (ratio > 2,75) que nous avons identifiée comme secondaire à la présence d'adipocire. Ces deux phénomènes sont distincts d'une éventuelle contamination de l'os qui aurait engendré l'incorporation au sein même de l'os de composés exogènes (van Klinken 1999). Le **ratio ALICO** est donc un indicateur **simple**, **fiable** et **rapide** attestant de la bonne **préservation** des constituants de l'os (collagène essentiellement) indépendamment de leurs quantités.

L'utilisation du ratio ALICO nous a permis de constater qu'il existait des caractéristiques communes aux **os altérés**. D'une part, tous nos échantillons altérés présentent des délais *post mortem* compris entre 2 et 90 ans ; d'autre part, ils proviennent essentiellement de milieux de conservation humides que ce soit parce que les individus ont été retrouvés immergés ou que les corps aient été inhumés dans des zones où le battage des nappes phréatiques était important. La présence de cette altération qui indique la présence d'**adipocire** est donc spécifique d'un milieu de conservation donné ; cependant, la transformation adipocireuse est un processus variable. Ainsi, Manheim (1997) rapporte que deux individus inhumés côte à côte dans un cimetière peuvent ou non présenter de l'adipocire en fonction de la quantité de masse graisseuse de l'individu au moment du décès, paramètre que nous ne connaissons souvent pas lorsque nous retrouvons des restes osseux squelettiques en contexte médico-légal. De plus, il retrouve des traces d'adipocire sur des individus inhumés plus de 100 ans auparavant.

Les **conditions de conservation** étant importantes (Jaggers et Rogers 2009), nous avons alors décidé d'analyser leur influence sur les spectres que nous avons réalisés en RMN du carbone-13 et du proton. Cependant, notre collection étant hétérogène en termes de représentativité des principaux milieux de conservation (inhumation en pleine terre, en cercueil, découverte en eau douce ou conservation dans les instituts médico-légaux ou les laboratoires d'anatomie) en fonction des intervalles *post mortem*, nous n'avons pas pu faire de conclusion sur leur influence. Nous avons réalisé une **expérimentation sur des os de faune** (*Sus scrofa*) que nous avons conservés en pleine terre et à l'air libre sur une durée de deux ans. Le choix d'utiliser des os de cochons domestiques (*Sus scrofa*) se justifie car des recherches ont montré que les os de cochons sont de analogues valides pour les os humains grâce à la similitude dans leur

composition et à leurs masses proches de celles des êtres humains (Aerssens *et al.* 1998 ; Forbes *et al.* 2005a). Les résultats obtenus sont certes peu nombreux (peu d'os analysés sur seulement deux ans) mais apparaissent pertinents quant à l'influence du milieu de conservation sur les profils spectraux observés. Nous avons constaté que les os enterrés étaient préservés (ratio ALICO dans l'intervalle de confiance) mais que leurs aires diminuaient dès la première année après le décès que ce soit en RMN du proton ou du carbone-13. En revanche, les os laissés à l'air libre présentaient une altération forte (ratio ALICO > 2,75) reliée à la présence d'adipocire. Ces premiers résultats sont à interpréter avec précaution puisque Hedges (2002) a montré qu'il existait une attaque microbienne différentielle entre les os présentant des tissus mous et ceux décharnés, ainsi qu'entre les os inhumés et ceux laissés à l'air libre.

En revanche, certaines études taphonomiques mettent en évidence que la nature du sol sur lequel le corps est placé a peu d'influence sur la dégradation de la matrice organique du tissu osseux pour un environnement tempéré et humide tel celui que nous retrouvons en Europe de l'Ouest. Aucune corrélation n'est alors retrouvée entre les effets du climat et la perte de collagène au sein de l'os (Fernandez-Jalvo *et al.* 2010). Par ailleurs, pour les os inhumés et dans les phases initiales de la décomposition, la nature du sol est peu importante car le corps va créer son propre microenvironnement lequel va lui-même modifier le sol environnant. Dans les premières phases, les facteurs les plus importants seront alors la microflore qui jouera un rôle dans la décomposition de la matière organique. Ce ne sera que dans un second temps que la composition chimique du sol aura une influence plus importante (Bell 1990).

Les conditions de conservation sont donc des paramètres importants à prendre en compte lorsqu'ils sont connus mais ce ne sont pas les seuls. En effet nous avons aussi vu que la masse grasseuse des individus était un facteur qui pouvait favoriser le phénomène de formation d'adipocire. Nous avons alors considéré l'influence de l'os utilisé pour les analyses en spectroscopie de RMN et l'influence des facteurs âge et sexe des individus.

3. VARIATIONS INTRA ET INTER-INDIVIDUELLES DES CONSTITUANTS DU TISSU OSSEUX

Nous avons comparé en RMN du carbone-13 et du proton différents os appartenant au même individu que ce soit des os contro-latéraux ou des os de nature différente (fémur, tibia, humérus, côte, vertèbre). Nous avons trouvé que le **fémur** était l'os qui présentait le **signal le plus intense** et que ce signal était constant quel que soit le côté étudié. Inversement, les côtes et les vertèbres présentaient les spectres les moins intenses et les moins bien définis. Nous retrouvons le même type de constat dans la littérature (Mays 2000 ; Forbes 2004 ; Introna *et al.* 1999) où le fémur est

considéré comme l'os le plus résistant aux processus diagénétiques grâce à l'épaisseur importante de la corticale osseuse. Les autres os longs tels les tibias et les humérus présentent aussi une résistance importante mais moindre que le fémur. Les os plus fragiles, présentant davantage d'os trabéculaire, telles les côtes, les métatarses ou les os des sujets immatures sont souvent contaminés et dégradés rapidement (Mays 2000 ; Janjua et Rogers 2008 ; Creamer et Buck 2009).

Nous avons donc choisi d'utiliser le fémur pour nos analyses. Un autre argument en faveur de l'utilisation du fémur est qu'il s'agit de l'os long le plus retrouvé en contexte médico-légal (61 %) suivi par les tibias (50 %) (Galloway 1997).

Nous avons ensuite étudié l'**influence des facteurs âge au décès et sexe** au sein de trois séries d'échantillons issues de notre collection globale et qui présentaient chacune des conditions de conservation et des délais *post mortem* sensiblement similaires.

Les analyses des spectres en **RMN du carbone-13** confortées par des tests statistiques ne montrent **aucune influence** de ces facteurs sur les aires et intensités spectrales mesurées et ce quelle que soit la collection.

En revanche, sur les spectres en **RMN du proton**, nous avons obtenu des résultats discordants entre les analyses des aires et des intensités spectrales. Rappelons, que l'étude de l'aire permet une approche globale du signal en intégrant les signaux des lipides, du collagène et de l'hydroxyapatite. Les variations de ces trois composés en fonction de l'âge au décès et du sexe pourront alors se compenser entre elles. D'un autre côté, l'étude des intensités spectrales est plus spécifique d'un groupe chimique donné mais sa mesure est plus délicate car dépendante de la résolution spectrale. Elle est donc soumise à plus d'imprécisions puisque un pic légèrement moins intense peut représenter une quantité de signal identique à une raie plus fine et plus intense. L'analyse des **aires spectrales** appuyées par les tests statistiques ne met en évidence **aucune influence** des facteurs âge au décès et sexe. En revanche, l'analyse des **intensités spectrales** présente des *p*-valeurs significatives pour le test de corrélation avec le sexe mais les coefficients de détermination sont faibles et donc ne sont pas révélateurs d'une réelle corrélation pour les individus de la collection BRUULB qui sont des individus dont le délai *post mortem* est 1 an. En revanche, malgré l'absence de corrélation, les femmes de cette collection présentent des intensités spectrales nettement supérieures à celles mesurées chez les hommes indiquant une différence quantitative avérée. Concernant le facteur âge au décès ou le facteur sexe, pour certains pics des individus de la collection MIL nous avons retrouvé des *p*-valeurs significatives mais les coefficients de détermination ne nous permettent pas ici aussi d'attester d'une réelle corrélation. Nous avons donc décidé de ne pas tenir compte de ces facteurs pour la suite de notre étude sur l'influence de l'intervalle *post mortem* sur les constituants du tissu osseux.

4. INFLUENCE DE L'INTERVALLE *POST MORTEM* SUR LE TISSU OSSEUX

Nous avons réalisé une analyse des spectres RMN du carbone-13 et du proton en trois phases : (1) sur notre collection globale ($n = 97$) où nous avons noté une variabilité assez importante des aires et intensités spectrales mesurées du fait de la présence des individus altérés ; (2) sur notre collection d'individus non altérés ($n = 85$) ; et (3) sur les individus altérés ($n = 12$).

Nous avons observé une **diminution du signal au cours du temps** que ce soit au niveau des aires ou des intensités spectrales (exception faite de l'intensité du groupe hydroxyle de l'hydroxyapatite obtenu en RMN du proton qui tend à augmenter dans les premiers siècles suivant le décès avant de subir lui aussi une diminution). Que ce soit en RMN du carbone-13 ou du proton, cette diminution suit un schéma bi exponentiel selon deux constantes de temps : une aux temps courts (de l'ordre de 400 ans en RMN du carbone-13 et de l'ordre de 5-10 ans en RMN du proton) et une aux temps longs (de l'ordre de 7 000-10 000 ans en RMN du carbone-13 et du proton). Les analyses en RMN du carbone-13, qui nous informent essentiellement sur le collagène osseux, montrent que la diminution de la quantité du collagène est plus importante dans les premiers siècles suivant le décès et se poursuit ensuite lentement pendant des millénaires. En effet, dans les premières décennies et siècles suivant le décès, les phénomènes de la diagenèse et notamment l'hydrolyse des liaisons peptidiques au sein de la fraction organique osseuse entraînent une diminution quantitative de cette même fraction. Le collagène osseux présente la particularité d'être minéralisé, il est donc moins sujet à l'hydrolyse. Dans les siècles qui suivent, la dissolution de la trame minérale (avec recristallisation de l'hydroxyapatite) libère ce collagène qui subit à son tour une dégradation (Nielsen-Marsh *et al.* 2000a ; Collins *et al.* 2002 ; Hedges 2002). Les analyses en RMN du proton, qui nous informent sur les lipides et le collagène, montrent une diminution des intensités spectrales très rapide dans les premières années suivant le décès puis une diminution plus lente de l'aire spectrale et une absence de détection de certains pics au cours des siècles suivant. Ceci s'explique par une perte rapide des lipides et un maintien plus long du collagène comme nous l'avons déjà observés sur les spectres RMN du carbone-13. Cependant, la dispersion des données dues en grande partie au manque d'information précise pour certains individus étudiés (*e.g.* âge, sexe, poids, délai *post mortem* précis, conditions de conservation, nature du sol), nous empêche pour l'instant d'utiliser le paramétrage bi-exponentiel pour déterminer avec précision le délai *post mortem*.

Dans la problématique de l'**estimation de l'intervalle *post mortem*** dans les contextes médico-légaux, les variations d'aires et d'intensités sur les temps courts seront donc les plus pertinentes. Elles sont là aussi dispersées pour les raisons évoquées au précédent paragraphe. Cependant, les spectres de RMN sont très informatifs et la présence ou non d'un pic associé à une espèce moléculaire peut nous aider dans la recherche de l'intervalle *post mortem*. Nous avons choisi de synthétiser nos résultats sous forme d'un **arbre décisionnel** (Figure 163) qui reprend les principales informations obtenues pour chaque type de spectre réalisé. Cet arbre n'est ni absolu ni universel et reflète les résultats d'un point de vue **qualitatif** c'est-à-dire la présence ou l'absence d'une raie spectrale et non l'intensité de cette raie. Nous avons choisi de ne pas

intégrer le côté quantitatif de nos analyses pour plusieurs raisons : dans les mêmes conditions d'acquisition, des personnes extérieures à notre laboratoire peuvent obtenir le même type de résultats mais il leur manquera l'analyse comparative précise qui nécessite l'utilisation de spectres de référence.

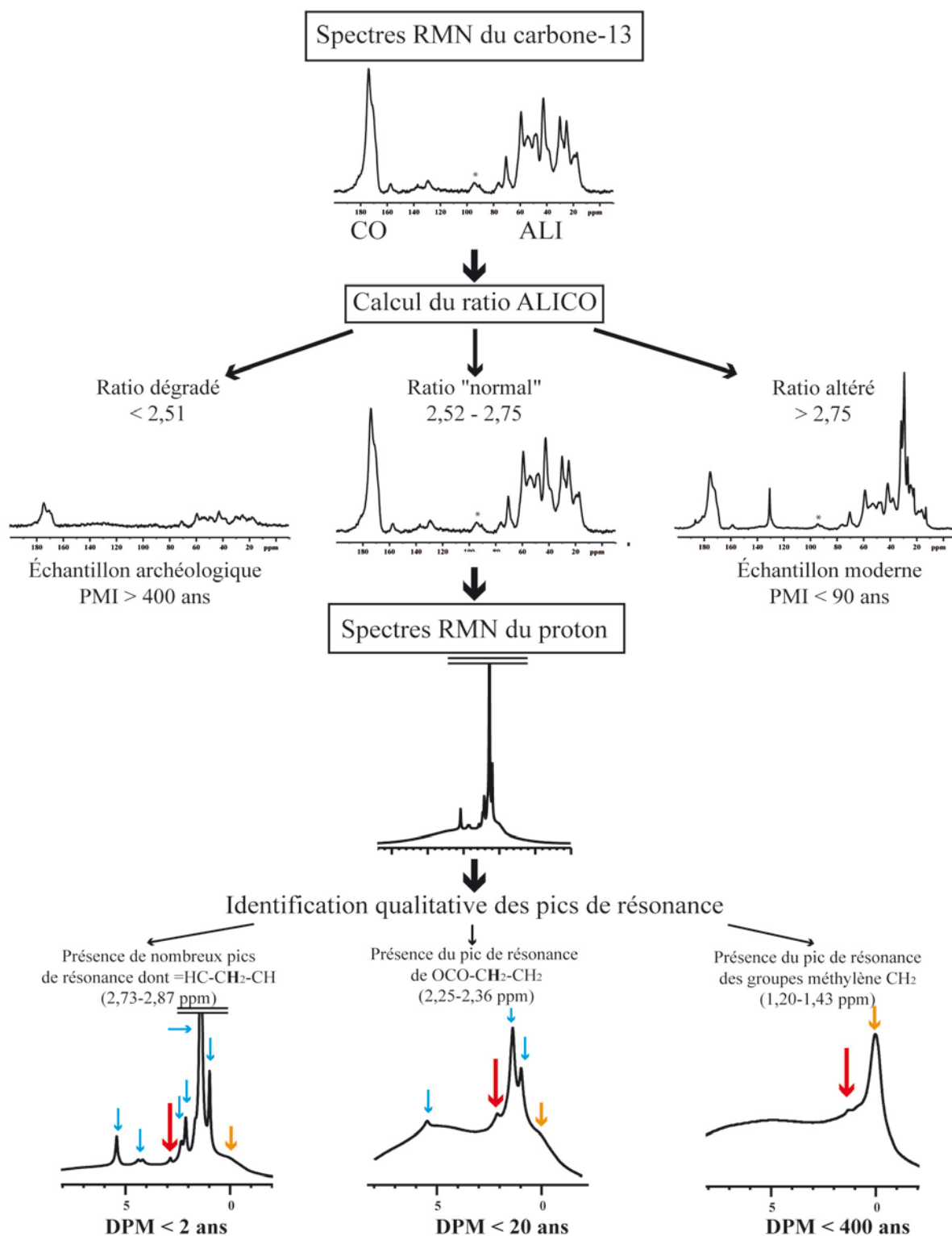


Figure 163 – Arbre décisionnel permettant de catégoriser un échantillon en fonction de son intervalle post mortem établi à partir des résultats de notre étude

→ Pic d'intérêt ; → pic du groupe hydroxyle de l'hydroxyapatite ; → pics de résonance des lipides
DPM : délai post mortem ; pour le calcul du ratio ALICO, se référer à la partie 5, chapitre 5.2, page 217.

Les intervalles *post mortem* fournis dans cet arbre ont été établis à partir des observations faites sur la collection que nous avons étudiée dans ce travail de thèse, ils ne sont donc pertinents en tant que tels qu'au sein de ces mêmes collections. Il faudrait alors interpréter avec précaution une utilisation ultérieure sur un échantillon provenant d'une autre collection. De même les intervalles fournis ne représentent pas des seuils mais des limites hautes de l'estimation.

Ainsi, en premier lieu, il convient de réaliser un spectre en RMN du carbone-13 et de déterminer les aires des chaînes aliphatiques et des groupes carboxyle afin de calculer le ratio ALICO. Trois possibilités peuvent se présenter :

- Le ratio apparaît diminué ($< 2,51$) : nous pouvons conclure que l'échantillon étudié est de nature archéologique puisque les seuls échantillons de notre collection présentant un tel ratio sont datés de plus de 400 ans ;
- Le ratio apparaît augmenté ($> 2,75$) : l'échantillon présente une altération due à une transformation adipocireuse ce qui permet d'attester de sa nature médico-légale avec un intervalle *post mortem* compris entre 2 et 90 ans.
- Le ratio apparaît « normal » ($[2,51-2,75]$) : l'échantillon est alors bien préservé ce qui ne signifie pas pour autant qu'il soit récent.

Dans un second temps, lorsque le ratio ALICO est compris dans l'intervalle de confiance, Il convient alors de réaliser un spectre en RMN du proton de l'échantillon lyophilisé afin d'étudier son profil et ses intensités spectrales. Ici aussi, plusieurs cas de figure peuvent se présenter :

- Analyse du pic de résonance des groupes méthylène $(CH_2)_n$ des lipides résonnant entre 1,20 et 1,43 ppm :
 - o soit il n'est pas détectable : l'échantillon relève de la sphère archéologique (> 400 ans) ;
 - o soit il est détectable est l'échantillon présente alors un intervalle *post mortem* inférieur à 400 ans.
- Le pic de résonance des groupes $OCO-CH_2-CH_2$ des lipides résonnant entre 2,25 et 2,36 ppm est détectable : l'échantillon appartient au domaine médico-légal avec une datation inférieure à 20 ans.
- Présence de nombreux pic de résonance dont le pic attribuable aux groupes $=HC-CH_2-CH$ des lipides résonnant entre 2,73 et 2,87 ppm : l'échantillon appartient au domaine médico-légal avec une datation inférieure à 2 ans.

L'évolution de ces pics en fonction de l'intervalle *post mortem* est cohérente avec la dégradation des lipides après le décès. En effet, dans le tissu osseux l'essentiel des lipides est représenté par des triglycérides dont les deux tiers sont insaturés. Au cours des premières phases de la décomposition, les triglycérides sont hydrolysés et libèrent ainsi des acides gras et des diglycérides lesquels seront à leur tour hydrolysés en acides gras. Parallèlement, les chaînes insaturées vont subir des phénomènes d'hydrogénation qui vont entraîner une disparition des

groupes méthine $\text{CH}=\text{CH}$ qui seront remplacés par des groupes méthylène CH_2-CH_2 (Castellano et Villanueva 1978a). Ce sont les mêmes phases de dégradation que l'on retrouve lors de la formation adipocireuse à la différence qu'elle ne concerne que les lipides intra-osseux et non les lipides extérieurs à l'os qui s'infiltrent dans la trame osseuse en cas d'altération adipocireuse.

Un seul échantillon soulève une réelle question, il s'agit de LYON-03. Cet échantillon dont le délai *post mortem* avoisine les 2 000 ans présente un profil spectral dégradé en RMN du carbone-13 (Ratio ALICO = 2,05) confirmant son statut archéologique. En revanche, l'analyse en RMN du proton met en évidence la présence du pic de résonance pour les groupes $=\text{HC}-\text{CH}_2-\text{CH}$ que nous n'avions jusque là attribué qu'à des échantillons dont l'intervalle *post mortem* était inférieur à deux ans. Par ailleurs, les autres pics utilisés dans notre arbre décisionnel ne sont pas détectables. Cet échantillon, issu de fouilles archéologiques a donc été contaminé par des lipides provenant probablement des différents opérateurs qui l'ont manipulé sans gant.

Les résultats que nous avons obtenus sur l'influence du délai *post mortem* sur nos échantillons osseux sont prometteurs mais il est important de compléter notre collection de référence afin d'affiner ces données.

5. PLACE DE LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DES SOLIDES PARMIS LES METHODES D'ESTIMATION DE L'INTERVALLE POST MORTEM

Au cours de notre travail, nous avons établi que les spectres RMN du carbone-13 et du proton nous apportaient de nombreuses informations sur les constituants du tissu osseux et notamment du collagène, des lipides et de l'hydroxyapatite. Ces différents constituants sont des indicateurs bien connus utilisés par les méthodes d'estimation de l'intervalle *post mortem*. Ainsi les méthodes fondées sur la fluorescence ultra-violette (Berg 1963 ; Saukko et Knight 2004 ; Ramsthaler *et al.* 2011) utilisent la fluorescence naturelle du tissu osseux (produite par les acides aminés aromatiques essentiellement). Ces méthodes reposent sur la quantification visuelle de cette fluorescence et sur sa répartition sur une section d'os ; cela induit une certaine subjectivité puisque la fluorescence ultra-violette sous la forme d'une lumière intense bleue pâle sur des os frais mais aussi présenter une teinte brune, jaune voire grise sur des os datés de plusieurs milliers d'années. Plusieurs hypothèses existent expliquant le fait qu'une certaine fluorescence puisse persister plusieurs centaines ou milliers d'années ; ainsi l'origine de la fluorescence au sein du tissu osseux est remise en cause et elle ne pourrait avoir une origine autre que celle des seuls acides aminés aromatiques (Hoke *et al.* 2013)

Dans notre travail, nous avons identifiés au sein du spectre RMN du carbone-13 les principaux acides aminés rentrant dans la composition du tissu osseux (glycine, alanine, proline et hydroxyproline) mais aussi les acides aminés aromatiques qui présentent une fréquence de

résonance aux environs de 129 ppm (Figure 34 et Tableau 13, pages 156 et 157 respectivement). La RMN présente toutefois plusieurs avantages à savoir que l'étude peut porter seulement sur les composés aromatiques (et pas sur d'éventuels autres composés qui pourraient fluorescer sous lumière ultra-violette) ; et nous pouvons aussi étudier les variations de tous les autres acides aminés du tissu osseux. La mise au point d'une méthode d'estimation de l'intervalle *post mortem* à partir d'analyses RMN du carbone-13 permettrait l'obtention de résultats plus spécifiques et ciblés que ceux actuellement obtenus par les méthodes utilisant la fluorescence ultra-violette.

Les spectres RMN du carbone-13 et du proton nous informent sur la matière organique (collagène et lipides) et donc nous permettent de suivre la décroissance de la quantité de matière organique au cours du temps. Cette décroissance est utilisée notamment par la méthode d'estimation du délai *post mortem* employant une coloration au bleu de Nil (Berg 1963 ; Beauthier *et al.* 2011). Cette méthode actuellement employée à l'IRCGN (Rosny-sous-Bois) permet de convertir une intensité de coloration bleue en intervalle *post mortem*. En effet, ce colorant présente une affinité pour le tissu osseux lorsque celui-ci est dépourvu de matière organique. Cependant, même si la coloration initiale du tissu osseux est prise en compte afin de diminuer son influence sur la coloration au bleu de Nil, cette méthode demeure controversée tant la quantification de la coloration pour les intervalles *post mortem* courts est difficile. Nous avons vu que les analyses RMN nous permettaient d'obtenir des informations similaires en ajoutant une composante qualitative et quantitative. Ainsi nous pouvons observer la décroissance du collagène (RMN du carbone-13) et des lipides (RMN du proton) indépendamment l'un de l'autre ce que n'autorise pas la coloration au bleu de Nil. Ensuite, nos échantillons ne subissent aucun traitement chimique (coloration entre autre) ce qui nous permet de réitérer l'analyse si besoin ou de réaliser secondairement d'autres analyses (*e.g.* ADN, isotopes, coloration).

Si nous considérons les méthodes histologiques (Nokes *et al.* 1987 ; Yoshino *et al.* 1991) et notamment la mise en évidence des phénomènes de recristallisation de l'hydroxyapatite au sein de la trame du tissu osseux, nous constatons c'est un phénomène que nous mettons aussi en évidence par RMN du proton.

Les analyses RMN du carbone-13 et du proton permettent donc une étude des mêmes paramètres que ceux évoqués dans les méthodes précédemment citées. Il est encore nécessaire d'approfondir nos recherches afin d'appréhender ces questions avec une approche quantitative robuste et fiable. Cependant, la RMN possède de nombreux avantages : d'une part, la quantité de matière nécessaire est peu importante et elle ne nécessite pas de traitement chimique. Ceci permet la réalisation des analyses RMN du carbone-13 et du proton sur un seul échantillon et elle permet aussi de mener des analyses ultérieures que ce soit des analyses RMN dans un but de validation des résultats ou que ce soit pour des analyses différentes. D'autre part, cette technique permet à elle seule d'étudier les paramètres corrélés à l'intervalle *post mortem* qui étaient étudiés par différentes méthodes (matière organique, recristallisation de l'hydroxyapatite). Elle permet donc une étude globale des échantillons de tissu osseux tout en étant spécifique aux constituants

d'intérêt. En l'état de notre recherche, nous ne pouvons pas encore utiliser les données RMN pour estimer l'intervalle *post mortem* mais elles pourraient déjà être utiles pour faire une analyse préliminaire de nos échantillons car elles permettent de vérifier que l'échantillon n'est pas altéré (cf. ratio ALICO), que le collagène est présent et bien préservé, qu'il persiste ou non des lipides, et que la recristallisation de l'hydroxyapatite s'est produite. C'est donc une technique prometteuse qui nécessite d'être approfondie.

CONCLUSIONS

PERSPECTIVES

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

L'estimation du délai *post mortem* est une problématique récurrente en anthropologie médico-légale. De nombreuses études sont menées afin d'établir des méthodes permettant son estimation de manière fiable, précise tout en étant peu coûteuse et facile à mettre en œuvre. Les différentes approches développées se heurtent à la réalité de la recherche sur l'être humain. D'une part, le corps humain – et les tissus le composant – n'est pas un matériel que l'on peut utiliser aussi aisément qu'une molécule ou qu'un fragment mobilier en céramique sur lesquels l'expérimentation via la synthèse d'une molécule ou la réalisation d'un duplicata en céramique est possible. En France, la législation limite la recherche scientifique sur le corps humain réalisée dans un autre but que la recherche biomédicale. L'obtention et l'utilisation de tissu osseux sont donc très difficiles pour mener à bien nos recherches et, si un tel matériel est obtenu, aucune expérimentation ne peut être envisagée. Ces difficultés rencontrées en France se retrouvent de façon plus ou moins similaire dans d'autres pays. D'autre part, lorsque l'on a accès à un tel matériel, il faut faire face à l'originalité de l'évolution du tissu osseux en fonction du temps : aucun individu ni aucune situation de découverte de corps en contexte médico-légal ne sont similaires. Les collections humaines utilisées pour de telles études sont donc, par nature, hétérogènes en termes de recrutement des individus (*e.g.* âge, sexe, pathologies), de conditions de conservation (*e.g.* cercueil, pleine terre, air libre) et bien évidemment de délais *post mortem*.

Face à toutes ces difficultés, l'estimation du délai *post mortem* demeure une thématique d'actualité qui génère de nombreuses publications scientifiques et de nouvelles approches méthodologiques. C'est dans ce contexte que se situe ce travail de thèse dont l'objectif était d'étudier l'influence du délai *post mortem* sur les constituants du tissu osseux par spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire des solides.

Afin de parvenir à ce but, il a fallu, dans un premier temps, établir un protocole d'étude en spectroscopie RMN propre au tissu osseux, matériau qui est, à ce jour, très peu étudié par cette technique. L'identification objective et reproductible de ses différentes composantes (*e.g.* collagène, lipides et hydroxyapatite), notamment par RMN des solides du carbone-13 et du proton, nous a permis de mettre en évidence des modifications spectrales sur quelques uns de nos échantillons. Ces modifications ne relèvent pas d'une contamination de nos échantillons au sens de l'incorporation de composés chimiques extérieurs à la composition initiale du tissu osseux mais proviennent de la dégradation attendue du tissu osseux. Ainsi, sur nos échantillons les plus anciens, nous avons mis en évidence une dégradation, essentiellement du collagène, importante. Ce résultat est connu et est largement étudié dans la littérature. En revanche, sur des échantillons plus récents et de manière non systématique nous avons identifié une altération des spectres attestant du processus de formation d'adipocire au sein du tissu osseux. Cette altération a pu être objectivée de manière fiable et reproductible grâce à l'utilisation du ratio ALICO que nous avons établi. Ces individus « altérés » ont été soustraits à la collection étudiée afin de ne

pas biaiser les résultats ultérieurs même si, en soi, la présence d'une altération due à une transformation adipocireuse nous apporte des informations intéressantes sur le délai *post mortem* puisque, au sein de notre collection, nous ne la retrouvons que sur des individus dont le décès est daté de 2 à 90 ans.

Dans un second temps, nous avons étudié à proprement parler de l'influence du délai *post mortem* sur les constituants du tissu osseux précédemment définis. Nous avons constaté que les spectres obtenus en RMN du carbone-13 et du proton nous apportaient des informations complémentaires. Ainsi, les spectres RMN du carbone-13 nous permettent d'identifier les échantillons dégradés ou altérés et, pour les échantillons non altérés, d'identifier le collagène de type I (et les acides aminés qui les composent) et, dans une moindre mesure, d'attester de la présence de lipides. Les acides aminés du collagène présentent une décroissance au cours du temps d'un point de vue quantitatif et qualitatif ; cependant, notre étude s'est essentiellement concentrée sur l'aspect qualitatif de cette décroissance. Par ailleurs, les spectres RMN du proton permettent l'identification essentiellement des lipides qui apparaissent sous forme de raies fines dont les déplacements chimiques sont caractéristiques de leurs différents groupes fonctionnels, mais aussi l'identification de la matière organique sous forme d'un massif plus diffus et élargi, et l'identification de l'hydroxyapatite. Il apparaît que les lipides présentent une décroissance rapide au cours du temps – de l'ordre de quelques décennies – liée à leur dégradation par des phénomènes d'hydrogénation et d'hydrolyse. Inversement, l'hydroxyapatite voit sa quantité croître à la suite d'une recristallisation de la trame minérale. Les comportements de ces différents constituants nous a permis de mettre au point une démarche analytique préliminaire afin de catégoriser un échantillon en fonction de son intervalle *post mortem*. Cependant, nous n'avons pas réussi à obtenir une précision suffisante pour établir une méthode d'estimation du délai *post mortem* en raison du nombre importants de paramètres qui influencent l'évolution des composants du tissu osseux en fonction du temps.

Ce travail apporte une approche nouvelle sur cette problématique par l'utilisation d'une nouvelle technique. Les résultats sont prometteurs et ouvrent la voie à de nombreuses perspectives. Tout d'abord, d'un point de vue pratique et technique, il convient de réaliser ce même types d'acquisitions RMN au sein d'autres plateformes RMN, ou sur d'autres spectromètres fin de vérifier la reproductibilité de notre protocole d'étude. Ensuite, d'un point de vue méthodologique, il sera nécessaire d'étudier la variabilité du tissu osseux obtenu sur des corps frais afin d'établir un « standard » pour les spectres RMN du carbone-13 et RMN du proton. La construction de ce « standard » nous permettra alors de développer une approche quantitative et non plus seulement qualitative de notre problématique. Nous avons constaté au cours de ce travail que beaucoup de paramètres avaient une influence, plus ou moins marquée, sur les profils spectraux observés. L'hétérogénéité de notre collection ne nous a pas permis d'établir des hypothèses très développées sur l'influence de ces paramètres. Afin d'approfondir ce travail, il est capital d'étoffer la collection d'étude que ce soit au niveau des effectifs qui la

constituent (représentation uniformément répartie des intervalles post mortem ; représentation de toutes les classes d'âge y compris les sujets immatures) mais aussi des informations relatives aux conditions de conservation et/ou de traitement des corps (*e.g.* inhumation en pleine terre, en cercueil, dépôt en plein air, déplacement du corps, immersion). Cependant, la connaissance de tous ces paramètres n'est pas suffisante à elle seule : en effet, il faut avoir vu une approche plus large de la définition des conditions de conservation avec notamment la prise en compte des facteurs climatiques ou géologiques (*e.g.* caractérisation du sol, présence de battage d'une nappe phréatique).

L'estimation de l'intervalle *post mortem* ne se résume pas à l'étude de l'individu seul mais aussi à l'étude de son environnement, et dans ce domaine, de nombreuses pistes sont encore à explorer.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- (2011) *Code de la recherche*. Commission supérieure de codification, Paris.
- (2012) *Code civil*. 112^{ème} édition, Dalloz, Paris.
- (2012) *Code de la santé publique*. 26^{ème} édition, Dalloz, Paris.
- (2012) *Code général des collectivités territoriales*. 16^{ème} édition, Dalloz, Paris.
- (2012) *Code de procédure pénale*. 54^{ème} édition, Dalloz, Paris.
- (2012) *Code pénal*. 110^{ème} édition, Dalloz, Paris.
- Adam, F.** (2012a) Metz-Vallières, Moselle, rue Jeanne Jugan : Ancien cimetière des Petites Soeurs des Pauvres. Inrap Grand Est nord, Metz.
- Adam, F.** (2012b) Sorbey, Meuse, forêt communale. Inrap Grand Est nord, Metz.
- Adlam R. E. et Simmons T.** (2007) The effect of repeated physical disturbance on soft tissue decomposition - Are taphonomic studies an accurate reflection of decomposition? *Journal of Forensic Sciences* 52, 1007-1014.
- Aerssens J., Boonen S., Lowet G. et Dequeker J.** (1998) Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for *in vivo* bone research. *Endocrinology* 139, 663-670.
- Alfano D., Romina Albulia A., Motta O. et Proto A.** (2009) Detection of diagenetic alterations by spectroscopic analysis on archaeological bones from the necropolis of Poseidonia (Paestum): a case study. *Journal of Cultural Heritage* 10, 509-513.
- Ambrose S. H.** (1990) Preparation and characterization of bone and tooth collagen for isotopic analysis, *Journal of Archaeological Science* 17, 431-451.
- Ambrose S. H. et Norr L.** (1993) Experimental evidence for the relationship of the carbon isotope ratios of whole diet and dietary protein to those of bone collagen and carbonate, In : *Prehistoric human bone: archaeology at the molecular level* (Lambert J. B. et Grupe G., Eds.), pp 1-37, Springer-Verlag, Berlin.
- Arnoux, I.** (2003) *Les droits de l'être humain sur son corps*. Presses Universitaires de Bordeaux, Pessac.
- Ayers L. E.** (2010) Differential decomposition in terrestrial, freshwater, and saltwater environments: a pilot study. In : *Anthropology*, p 118, Texas, San Marcos.
- Baccino E., De Saint Martin L., Schuliar Y., Guilloteau P., Le Rhun M., Morin J. F., Leglise D. et Amice J.** (1996) Outer ear temperature and time of death. *Forensic Science International* 83, 133-146.
- Balzer A., Gleixner G., Grupe G., Schmidt H.-L., Schramm S., et Turban-Just S.** (1997) *In vitro* decomposition of bone collagen by soil bacteria: the implications for stable isotope analysis in archaeometry. *Archaeometry* 39, 415-429.
- Bass W. M.** (1997) Outdoor decomposition rates in Tennessee. In : *Forensic taphonomy: The postmortem fate of human remains* (Haglund W. D., and Sorg M. H., Eds.), pp 181-186, CRC Press, Boca Raton.
- Beauthier J.-P.** (2011) *Traité de médecine légale*. De Boeck, Bruxelles.

- Beauthier J.-P., Lefèvre P., Orban R., Polet C., Grévin G. et Quatrehomme G.** (2011) L'anthropologie et la personne décédée. In : *Traité de médecine légale* (Beauthier J.-P., Ed.), pp 565-627, De Boeck.
- Beauthier J.-P., Lefevre P., Polet C., Werquin J.-P. et Orban R.** (2010) Les aléas d'une enquête anthropologique sur des squelettes de la Première Guerre mondiale. *Journal de Médecine Légale Droit Médical* 53, 303-311.
- Bell L. S.** (1990) Palaeopathology and diagenesis: an SEM evaluation of structural changes using backscattered electron imaging. *Journal of Archaeological Science* 17, 85-102.
- Berg S.** (1963) The determination of bone age. *Methods of Forensic Science* 2, 231-252.
- Bigi A., Cojazzi G., Panzavolta S., Ripamonti A., Roveri N., Romanello M., Noris Suarez K. et Moro L.** (1997) Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone. *Journal of Inorganic Biochemistry* 68, 45-51.
- Bolboaca S. D. et Jantschi L.** (2007) Amino acids sequence analysis on collagen. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine - Cluj-Napoca* 63-64, 311-316.
- Breitmeier D., Graefe-Kirci U., Albrecht K., Weber M., Tröger H. D. et Kleemann W. J.** (2005) Evaluation of the correlation between time corpses spent in in-ground graves and findings at exhumation. *Forensic Science International* 154, 218-223.
- Brodsky B. et Persikov A. V.** (2005) Molecular structure of the collagen triple helix. *Advances in Protein Chemistry* 70, 301-339.
- Bundi A. et Wüthrich K.** (1979) ¹H-NMR parameters of the common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides H-Gly-Gly-X-L-Ala-OH. *Biopolymers* 18, 285-297.
- Burton J.** (2008) Bone chemistry and trace element analysis. In : *Biological anthropology of the human skeleton* (Katzenberg A. et Saunders S. R., Eds.), pp 443-460, John Wiley & Sons, New Jersey.
- Callies I., de Montgolfier S., Moutel G. et Hervé C.** (2004) Enjeux éthiques des collections d'échantillons humains dans le cadre de la recherche. *Droit, Déontologie et Soins* 4, 148-164.
- Canet D., Boubel J.-C. et Canet Soulas E.** (2002) *La RMN : Concepts, méthodes et applications*. 2^{ème} édition, Dunod, Paris.
- Cardoso H. F. V., Santos A., Dias R., Garcia C., Pinto M., Sergio C. et Magalhaes T.** (2010) Establishing a minimum postmortem interval of human remains in an advanced state of skeletonization using the growth rate of bryophytes and plant roots. *International Journal of Legal Medicine* 124, 451-456.
- Castellano M. A. et Villanueva E. C.** (1977) Estudio sobre la evolución de los lípidos en restos óseos en función de la data. I). Lípidos totales. *Zacchia* 52.
- Castellano M. A. et Villanueva E. C.** (1978a) Estudio sobre la evolución de los lípidos en restos óseos en función de la data. II). Colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres. *Zacchia* 53, 61-72.
- Castellano M. A. et Villanueva E. C.** (1978b) Estudio sobre la evolución de los lípidos en restos óseos en función de la data. III). Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos libres por cromatografía de gases. *Zacchia* 53, 347-355.

- Castellano M. A., Villanueva E. C. et von Frenckel R.** (1984) Estimating the date of bone remains: a multivariate study. *Journal of Forensic Sciences* 29, 527-534.
- Chavassieux P. et Meunier P.** (2003) Histologie et cytologie de l'os normal. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* 14-002-A-10, 1-6.
- Cho C., Wu Y. et Ackerman J. L.** (2003) Detection of Hydroxyl ions in bone mineral by solid-state NMR spectroscopy. *Science* 300, 1123-1127.
- Claire G.** (2011) L'exposition anatomique "Our Body" : une atteinte à la dignité du cadavre ? *Médecine & Droit* 2011, 136-142.
- Clark M. A., Worrell M. B. et Pless J. E.** (1997) Postmortem changes in soft tissues. In : *Forensic taphonomy: The postmortem fate of human remains* (Haglund W. D. et Sorg M. H., Eds.), pp 151-164, CRC Press, Boca Raton.
- Collins M. J., Nielsen-Marsh C. M., Hiller J., Smith C. I., Roberts J. P., Prigodich R. V., Wess T. J., Csapo J., Millard A. R. et Turner-Walker G.** (2002) The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry* 44, 383-394.
- Connolly R. C.** (1985) Lindow Man: Britain's Prehistoric Bog Body. *Anthropology Today* 1, 15-17.
- Conte P., Piccolo A., van Lagen B., Buurman P. et de Jager P. A.** (1997) Quantitative aspects of solid-state ^{13}C -NMR spectra of humic substances from soils of volcanic systems. *Geoderma* 80, 327-338.
- Cook R. L. et Langford C. H.** (1998) Structural characterization of a fluvic acid and a humic acid using solid-state ramp-CP-MAS ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance. *Environmental Science and Technology* 32, 719-725.
- Cook R. L., Langford C. H., Yamdagni R. et Preston C. M.** (1996) A modified cross-polarization magic angle spinning ^{13}C NMR procedure for the study of humic materials. *Analytical Chemistry* 68, 3979-3986.
- Cornillon P.-A. et Matszner-Lober E.** (2007) *Régression théorie et applications*. Springer, Paris.
- Creamer J. I. et Buck A. M.** (2009) The assaying of haemoglobin using luminol chemiluminescence and its application to the dating of human skeletal remains. *Luminescence* 24, 311-316.
- de Carmejane O., Morris M. D., Davis M. K., Stixrude L., Tecklenburg M., Rajachar R. M. et Kohn D. H.** (2005) Bone chemical structure response to mechanical stress studied by high pressure Raman spectroscopy. *Calcified Tissue International* 76, 207-213.
- De Jong W. F.** (1926) La substance minérale dans les os. *Recueil des travaux chimiques des Pays-Bas* 45, 445-448.
- Di Maio V. J. et Di Maio D.** (2001) Time of Death. In : *Forensic Pathology* (Di Maio V. J. et Di Maio D., Eds.), pp 21-41, CRC Press, Boca Raton.
- Dickens F.** (1941) The citric acid content of animal tissues, with reference to its occurrence in bone and tumour. *Biochemical Journal* 35, 1011-1023.
- Dirkmaat D. C., Cabo L. L., Ousley S. D. et Symes S. A.** (2008) New perspectives in forensic anthropology. *Yearbook of Physical Anthropology* 51, 33-52.
- Dorozhkin S. V.** (2007) Calcium orthophosphates. *Journal of Materials Science* 42, 1061-1095.

- Duday H., Courtaud P., Crubézy E., Sellier P. et Tillier A.-M.** (1990) L'anthropologie "de terrain" : reconnaissance et interprétation des gestes funéraires. *Bulletins et Mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris* 2, 29-49.
- Duday H.** (2009) *The archaeology of the dead*. Oxford books, Oxford.
- Duguet A.-M.** (2010) Le statut du corps après la mort et le respect de sa dignité. *La Revue de Médecine Légale* 1, 79-80.
- Efremov I. A.** (1940) Taphonomy: new branch of paleontology. *Pan-American geologist* 74, 81-93.
- Elliott T. A. et Grime G. W.** (1993) Examining the diagenetic alteration of human bone material from a range of archaeological burial sites using nuclear microscopy. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 77, 537-547.
- Fernandez-Jalvo Y., Andrews P., Pesquero D., Smith C., Marin-Monfort D., Sanchez B., Geigl E.-M. et Alonso A.** (2010) Early bone diagenesis in temperate environments Part I: Surface features and histology. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 288, 62-81.
- Fischer J. W., Merwin L. H. et Nissan R. A.** (1995) NMR investigation of the thermolysis of citric acid. *Applied Spectroscopy* 49, 120-126.
- Fitzgerald C. M. et Oxenham M.** (2009) Modelling time-since-death in Australian temperate conditions. *Australian Journal of Forensic Sciences* 41, 27-41.
- Forbes S.** (2004) Time since death: a novel approach to dating skeletal remains. *Australian Journal of Forensic Sciences* 36, 67-72.
- Forbes S. L., Dent B. B. et Stuart B. H.** (2005a) The effect of soil type on adipocere formation. *Forensic Science International* 154, 35-43.
- Forbes S. L., Stuart B. H. et Dent B. B.** (2005b) The effect of the burial environment on adipocere formation. *Forensic Science International* 154, 24-34.
- Forbes S. L., Stuart B. H. et Dent B. B.** (2005c) The effect of the method of burial on adipocere formation. *Forensic Science International* 154, 44-52.
- Fujisawa R. et Kuboki Y.** (1990) High-resolution solid-state nuclear magnetic resonance spectra of dentin collagen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 167, 761-766.
- Fulmer G. R., Miller A. J. M., Sherden N. H., Gottlieb H. E., Nudelman A., Stoltz B. M., Bercaw J. E. et Goldberg K. I.** (2010) NMR chemical shifts of trace impurities: Common laboratory solvents, organics et gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. *Organometallics* 29, 2176-2179.
- Galloway A.** (1997) The process of decomposition: a model from the Arizona-Sonoran desert. In : *Forensic taphonomy: The postmortem fate of human remains* (Haglund W. D. et Sorg M. H., Eds.), pp 139-150, CRC Press, Boca Raton.
- Galloway A., Birkby W. H., Jones A. M., Henry T. E. et Parks B. O.** (1989) Decay rates of human remains in an arid environment. *Journal of Forensic Sciences* 34, 607-616.
- Galloway A., Willey P. et Snyder L.** (1997) Human bone mineral densities and survival of bone elements: a contemporary sample. In : *Forensic taphonomy: The postmortem fate of human remains* (Haglund W. D. et Sorg M. H., Eds.), pp 295-317, CRC Press, Boca Raton.
- Garrett R. H. et Grisham C. M.** (2000) *Biochimie*. De Boeck Université, Paris.

- Gemmerich I.** (1999) Création d'une collection anthropologique de référence et application des caractères discrets dans le cas de généalogies connues. *Thèse de doctorat*, Université de Genève.
- Gill J. R., Desire M., Dickerson T. et Adams B. J.** (2011) The 9/11 attacks: the medicolegal investigation of the world trade center fatalities. In : *Forensic Pathology Reviews* (Turk E. E., Ed.), pp 181-195, Springer Science, Totowa, NJ.
- Gill-King H.** (1997) Chemical and ultrastructural aspects of decomposition. In : *Forensic taphonomy: The postmortem fate of human remains* (Haglund W. D. et Sorg M. H., Eds.), pp 93-108, CRC Press, Boca Raton.
- Gokhale J. A., Boskey A. L. et Robey P. G.** (2001) The biochemistry of bone. In : *Osteoporosis*, 2^{ème} édition, pp 107-188, Academic Press, San Diego.
- Gottlieb H. E., Kotlyar V. et Nudelman A.** (1997) NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *Journal of Organic Chemistry* 62, 7512-7515.
- Grélard A., Couvreur A., Loudet C. et Dufourc E. J.** (2009) Solution and Solid-State NMR of Lipids. In : *Lipid Signaling Protocols* (Larijani B., Woscholski R. et Rosser C. A., Eds.), pp 111-133, Humana Press, Totowa.
- Grün R.** (1989) Electron spin resonance (ESR) dating. *Quaternary International* 1, 65-109.
- Grupe G.** (1988) Impact of the choice of bone samples on trace element data in excavated human skeletons. *Journal of Archaeological Science* 15, 123-129.
- Grupe G.** (1995) Preservation of collagen in bone from dry, sandy soil. *Journal of Archaeological Science* 22, 193-199.
- Guillen M. D. et Ruiz A.** (2003a) ¹H nuclear magnetic resonance as a fast tool for determining the composition of acyl chains in acylglycerol mixtures. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105, 502-507.
- Guillen M. D. et Ruiz A.** (2003b) Rapid simultaneous determination by proton NMR of unsaturation and composition of acyl groups in vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105, 688-696.
- Gullion T. et Schaefer J.** (1989) Rotational-Echo Double-Resonance NMR. *Journal of Magnetic Resonance* 81, 196-200.
- Günther H.** (1996) *La spectroscopie de RMN : Principe de base, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13 en chimie*. Masson, Paris.
- Haglund W. D. et Sorg M. H.** (1997a) Method and theory of forensic taphonomy research. In : *Forensic taphonomy: The postmortem fate of human remains* (Haglund W. D. et Sorg M. H., Eds.), pp 13-26, CRC Press, Boca Raton.
- Haglund W. D. et Sorg M. H.** (1997b) *Forensic taphonomy: The postmortem fate of human remains*. CRC Press, Boca Raton.
- Hall D. W.** (1997) Forensic Botany. In : *Forensic taphonomy: The postmortem fate of human remains* (Haglund W. D. et Sorg M. H., Eds.), pp 353-363, CRC Press, Boca Raton.
- Hartles R. L.** (1964) Citrate in mineralized tissues. *Advances in Oral Biology* 1, 225-253.
- Haslam T. C. F. et Tibbett M.** (2009) Soils of constrating pH affect the decomposition of buried mammalian (*Ovis aries*) skeletal mucle tissue. *Journal of Forensic Sciences* 54, 900-904.

- Hedges R. E. M.** (2002) Bone diagenesis: an overview of processes. *Archaeometry* 44, 319-328.
- Hedges R. E. M., Millard A. R. et Pike A. W. G.** (1995) Measurements and relationships of diagenetic alteration of bone from three archaeological sites. *Journal of Archaeological Science* 22, 201-209.
- Henssge C. et Madea B.** (2004) Estimation of the time since death in the early post-mortem period. *Forensic Science International* 144, 167-175.
- Hesler N. D.** (2002) L'admissibilité des nouvelles théories scientifiques. Les juges, filtres du savoir ? *Revue du barreau* 62, 361-385.
- Hoke N., Grigat A., Grupe G. et Harbeck M.** (2013) Reconsideration of bone postmortem interval estimation by UV-induced autofluorescence. *Forensic Science International* 228.
- Hou G., Deng F., Ding S., Fu R., Yang J. et Ye C.** (2006) Quantitative cross-polarization NMR spectroscopy in uniformly ^{13}C -labeled solids. *Chemical Physics Letters* 421, 356-360.
- Hu J. Z., Wang W., Bai S., Pugmire R. J., Taylor C. M. V. et Grant D. M.** (2000) Investigation of polyethylene by means of magic angle turning and separated-local-field experiments. *Macromolecules* 33, 3359-3367.
- Hu Y.-Y., Rawal A. et Schmidt-Rohr K.** (2010) Strongly bound citrate stabilizes the apatite nanocrystals in bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 107, 22425-22429.
- Huster D., Schiller J. et Arnold K.** (2002) Comparison of collagen dynamics in articular cartilage and isolated fibrils by solid-state NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine* 48, 624-632.
- Introna F., Di Vella G. et Campobasso C. P.** (1999) Determination of postmortem interval from old skeletal remains by image analysis of luminol test results. *Journal of Forensic Sciences* 44, 535-538.
- Jaeger C., Groom N. S., Bowe E. A., Horner A., Davies M. E., Murray R. C. et Duer M. J.** (2005) Investigation of the nature of the protein-mineral interface in bone by solid-state NMR. *Chemistry of Materials* 17, 3059-3061.
- Jagers K. A. et Rogers T. L.** (2009) The effects of soil environment on postmortem interval: a macroscopic analysis. *Journal of Forensic Sciences* 54, 1217-1222.
- Janjua M. A. et Rogers T. L.** (2008) Bone weathering patterns of metatarsal v. femur and the postmortem interval in Southern Ontario. *Forensic Science International* 178, 16-23.
- Jarvis D. R.** (1997) Nitrogen levels in long bones from coffin burials interred for periods of 26-90 years. *Forensic Science International* 85, 199-208.
- Kaflak A., Chmielewski D., Gorecki A., Slosarczyk A. et Kolodziejewski W.** (2006) Efficiency of ^1H to ^{31}P NMR cross-polarization in bone apatite and its mineral standards. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* 29, 345-348.
- Kaflak-Hachulska A., Samoson A. et Kolodziejewski W.** (2003) ^1H MAS and ^1H - ^{31}P CP/MAS NMR study of human bone mineral. *Calcified Tissue International* 73, 476-486.
- Kaiser C., Bachmeier B., Conrad C., Nerlich A., Bratzke H., Eisenmenger W. et Peschel O.** (2008) Molecular study of time dependent changes in DNA stability in soil buried skeletal residues. *Forensic Science International* 177, 32-36.
- King C. L., Tayles N. et Gordon K. C.** (2011) Re-examining the chemical evaluation of diagenesis in human bone apatite. *Journal of Archaeological Science* 38, 2222-2230.

- Knight B.** (1968) Estimation of the time since death: a survey of practical methods. *Journal of the Forensic Science Society* 8, 91-96.
- Knight B.** (1996) *Forensic pathology*. Oxford University Press, London.
- Knight B. et Lauder I.** (1969) Methods of dating skeletal remains. *Human Biology* 41, 322-341.
- Knuuttila M., Lappalainen R., Alakuijala P. et Lammi S.** (1985) Statistical evidence for the relation between citrate and carbonate in human cortical bone. *Calcified Tissue International* 37, 363-366.
- Kolodziejewski W.** (2004) Solid-state NMR studies of bone. *Topics in Current Chemistry* 246, 235-270.
- Komar D. A.** (1998) Decay rates in a cold climate region: a review of cases involving advanced decomposition from the medical examiner's office in Edmonton, Alberta. *Journal of Forensic Sciences* 43, 57-61.
- Kutschera W. et Rom W.** (2000) Ötzi, the prehistoric Iceman. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 164-165, 12-22.
- Lambert J. B., Vlasak S. M., Thometz A. C. et Buikstra J. E.** (1982) A comparative study of the chemical analysis of ribs and femurs in Woodland populations. *American Journal of Physical Anthropology* 59, 289-294.
- Lambert J. B., Xue L. et Buikstra J. E.** (1989) Physical removal of contaminative inorganic material from buried human bone. *Journal of Archaeological Science* 16, 427-436.
- Lee C. A. et Einhorn T. A.** (2001) The bone organ system: Form and function. In : *Osteoporosis* (Marcus R., Feldman D. et Kelsey J., Eds.) 2^{ème} édition, pp 3-20, Academic Press, San Diego.
- Legendre R.** (1993) *Dictionnaire actuel de l'éducation*. ESKA, Paris.
- LeGeros R. Z.** (1981) Apatites in biological systems. *Progress in Crystal Growth and Characterization* 4, 1-45.
- LeGeros R. Z.** (1991) Calcium phosphates in enamel, dentin and bone. In : *Calcium phosphates in oral biology and medicine* (Myers H. M., Ed.), pp 108-129, Karger, New York.
- Liu M., Moao X.-a., Ye C., Huang H., Nicholson J. K. et Lindon J. C.** (1998) Improved WATERGATE pulse sequences for solvent suppression in NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance* 132, 125-129.
- Ma J. F., Zheng S. J. et Matsumoto H.** (1997) Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. *Plant and Cell Physiology* 38, 1019-1025.
- MacLaughlin-Black S. M., Herd R. J. M., Willson K., Myers M. et West I. E.** (1992) Strontium-90 as an indicator of time since death: a pilot investigation. *Forensic Science International* 57, 51-56.
- Madea B.** (2005) Is there recent progress in the estimation of the postmortem interval by means of thanatochemistry? *Forensic Science International* 151, 139-149.
- Madea B. et Rödig A.** (2006) Time of death dependent criteria in vitreous humor - Accuracy of estimating the time since death. *Forensic Science International* 164, 87-92.
- Makristathis A., Schwarzmeier J., Mader R. M., Varmuza K., Simonitsch I., Chavez Chavez J., Platzer W., Unterdorfer H., Scheithauer R., Derevianko A. et Seidler H.** (2002) Fatty acid composition and preservation of the Tyrolean Iceman and other mummies. *Journal of Lipid Research* 43, 2056-2061.

- Manhein M. H.** (1997) Decomposition rates of deliberate burials: a case study of preservation. In : *Forensic taphonomy: The postmortem fate of human remains* (Haglund W. D. et Sorg M. H., Eds.), pp 469-481, CRC Press, Boca Raton.
- Mann R. W., Bass W. M. et Meadows L.** (1990) Time since death and decomposition of the human body: variables and observations in case and experimental field studies. *Journal of Forensic Sciences* 35, 103-111.
- Manuila L., Manuila A., Nicoulin M. et Duizabo D.** (1996) *Dictionnaire médical*, 7^{ème} édition édition, Masson, Paris.
- Marom A., McCullagh J. S. O., Higham T. F. G., Sinitsyn A. A. et Hedges R. E. M.** (2012) Single amino acid radiocarbon dating of Upper Paleolithic modern humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*.
- Mays S.** (2000) Age-dependent cortical bone loss in women from 18th and early 19th century London. *American Journal of Physical Anthropology* 112, 349-361.
- Megyesi M. S., Nawrocki S. P. et Haskell N. H.** (2005) Using accumulated degree-days to estimate the post mortem interval from decomposed human remains. *Journal of Forensic Sciences* 50, 618-626.
- Mellen P. F. M., Lowry M. A. et Micozzi M. S.** (1993) Experimental observations on adipocire formation. *Journal of Forensic Sciences* 38, 91-93.
- Merry J. C., Gibson I. R., Best S. M. et Bonfield W.** (1998) Synthesis and characterization of carbonate hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 9, 779-783.
- Metz G., Ziliox M. et Smith S. O.** (1996) Towards quantitative CP-MAS NMR. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* 7, 155-160.
- Mroue K. H., MacKinnon N., Xu J., Zhu P., McNerny E., Khon D. H., Morris M. D. et Ramamoorthy A.** (2012) High-resolution structural insights into bone: a solid-state NMR relaxation study utilizing paramagnetic doping. *Journal of Physical Chemistry B* 116, 11656-11661.
- Neis P., Hille R., Paschke M., Pilwat G., Schnabel A., Niess C. et Bratzke H.** (1999) Strontium 90 for determination of time since death. *Forensic Science International* 99, 47-51.
- Nielsen-Marsh C., Gernaey A., Turner-Walker G., Hedges R., Pike A. et Collins M.** (2000a) The chemical degradation of bone. In : *Human osteology in archaeology and forensic medicine* (Cox M. et Mays S., Eds.), pp 439-454, Greenwich Medical Media, London.
- Nielsen-Marsh C. M., Hedges R. E. M., Mann T. et Collins J. C.** (2000b) A preliminary investigation of the application of differential scanning calorimetry to the study of collagen degradation in archaeological bone. *Thermochimica Acta* 365, 129-139.
- Nielsen-Marsh C. M., Smith C. I., Jans M. M. E., Nord A., Kars H. et Collins M. J.** (2007) Bone diagenesis in the European Holocene II: taphonomic and environmental considerations. *Journal of Archaeological Science* 34, 1523-1531.
- Nokes L. D. M., Green M. et Knight B.** (1987) The use of scanning electron microscopy in the dating of human skeletal remains. *Journal of the Forensic Science Society* 27, 413-416.
- Notter S. J., Stuart B. H., Rowe R. et Langlois N.** (2009) The initial changes of fat deposits

- during the decomposition of human and pig remains. *Journal of Forensic Sciences* 54, 195-201.
- Olszta M. J., Cheng X., Soo Jee S., Kumar R., Kim Y.-Y., Kaufman M. J., Douglas E. P. et Gower L. B.** (2007) Bone structure and formation: a new perspective. *Materials Science and Engineering R* 58, 77-116.
- Pääbo S., Poinar H., Serre D., Jaenicke-Després V., Kuch M., Krause J., Vigilant L. et Hofreiter M.** (2004) Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Review of Genetics* 38, 645-679.
- Page M., Taylor J. et Blenkin M.** (2011a) Forensic identification science evidence since Daubert: part II - Judicial reasoning in decisions to exclude forensic identification evidence on grounds of reliability. *Journal of Forensic Sciences* 56, 913-917.
- Page M., Taylor J. et Blenkin M.** (2011b) Forensic identification science evidence since Daubert: part I - A quantitative analysis of the exclusion of forensic identification science evidence. *Journal of Forensic Sciences* 56, 1180-1184.
- Papenguth H. W., Kirkpatrick R. J., Montez B. et Sandberg P. A.** (1989) ^{13}C NMR spectroscopy of inorganic and biogenic carbonates. *American Mineralogist* 74, 1152-1158.
- Pasteris J. D., Wopenka B., Freeman J. J., Rogers K., Valsami-Jones E., van der Houwen J. A. M. et Silva M. J.** (2004) Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: implications for bone and biomaterials. *Biomaterials* 25, 229-238.
- Pate F. D. et Hutton J. T.** (1988) The use of soil chemistry data to address post-mortem diagenesis in bone mineral. *Journal of Archaeological Science* 15, 729-739.
- Pate F. D., Hutton J. T. et Norrish K.** (1989) Ionic exchange between soil solution and bone: toward a predictive model. *Applied Geochemistry* 4, 303-316.
- Perréard Lopreno G.** (2006) Les collections ostéologiques humaines du département d'Anthropologie et d'Écologie de l'Université de Genève. *Bulletin archéologique de Provence* 4, 85-90.
- Perry A., Styba M. P., Tenn B. K. et Kumashiro K. K.** (2002) Solid-state ^{13}C NMR reveals effects of temperature and hydration on elastin. *Biophysical Journal* 82, 1086-1095.
- Perry W. L., Bass W. M., Riggsby W. S. et Sirotkin K.** (1988) The autodegradation of deoxyribonucleic acid (DNA) in human rib bone and its relationship to the time interval since death. *Journal of Forensic Sciences* 33, 144-153.
- Pfeiffer S., Milne S. et Stevenson R. M.** (1998) The natural decomposition of adipocere. *Journal of Forensic Sciences* 43, 368-370.
- Piepenbrink H.** (1989) Examples of chemical changes during fossilisation, *Applied Geochemistry* 4, 273-280.
- Pinheiro J.** (2006) Decay process of a cadaver. In : *Forensic Anthropology and Medicine: complementary sciences from recovery to cause of death* (Schmitt A., Cunha E. et Pinheiro J., Eds.), pp 85-116, Humana Press Inc., Totowa.
- Plaud S.** (2010) Principe de précaution et progrès scientifique. *Revue Éthique et Économique* 7.
- Pretsch E., Bühlmann P. et Affolter C.** (2000) *Structure determination of organic compounds*. Springer, Berlin.
- Prieto J. L., Magaña C. et Ubelaker D. H.** (2004) Interpretation of postmortem change in cadavers in Spain. *Journal of Forensic Sciences* 49, 918-923.

- Raimbault P.** (2005) Le corps humain après la mort. Quand les juristes jouent au "cadavre exquis"... *Droit et Société* 61, 817-844.
- Ramanathan C. et Ackerman J. L.** (1999) Quantitative solid-state NMR imaging of synthetic calcium phosphate implant. *Magnetic Resonance in Medicine* 41, 1214-1220.
- Ramsthaler F., Ebach S. C., Birngruber C. G. et Verhoff M. A.** (2011) Postmortem interval of skeletal remains through the detection of intraosseal hemin traces. A comparison of UV-fluorescence, luminol, Hexagon-OBTI, and Combur tests. *Forensic Science International* 209, 59-63.
- Reiche I., Favre-Quattropiani L., Calligaro T., Salomon J., Bocherens H., Charlet L. et Menu M.** (1999) Trace element composition of archaeological bones and postmortem alteration in the burial environment. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 150, 656-662.
- Reid D. G., Duer M. J., Murray R. C. et Wise E. R.** (2008) The organic-mineral interface in teeth is like that in bone and dominated by polysaccharides: universal mediators of normal calcium phosphate biomineralization in vertebrates? *Chemistry of Materials* 20, 3549-3550.
- Ren J., Dimitrov I., Sherry A. D. et Malloy C. R.** (2008) Composition of adipose tissue and marrow fat in humans by ^1H NMR at 7 Tesla. *Journal of Lipid Research* 49, 2055-2062.
- Rey C., Miquel J. L., Facchini L., Legrand A. P. et Glimcher M. J.** (1995) Hydroxyl groups in bone mineral. *Bone* 16, 583-586.
- Rho J.-Y., Kuhn-Spearing L. et Zioupos P.** (1998) Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering & Physics* 20, 92-102.
- Roach H. I.** (1994) Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biology International* 18, 617-628.
- Rodriguez W. C.** (1997) Decomposition of buried and submerged bodies. In : *Forensic taphonomy: The postmortem fate of human remains* (Haglund W. D. et Sorg M. H., Eds.), pp 459-467, CRC Press, Boca Raton.
- Rodriguez W. C. et Bass W. M.** (1985) Decomposition of buried bodies and methods that may aid in their location. *Journal of Forensic Sciences* 30, 836-852.
- Roger G.** (2010) Structure et dynamique de substances humiques et polyélectrolytes modèles en solution. In : *Chimie Physique et Chimie Analytique*, p 170, Pierre et Marie Curie, Paris.
- Ross A. H. et Cunningham S. L.** (2011) Time-since-death and bone weathering in a tropical environment. *Forensic Science International* 204, 126-133.
- Roufosse A. H., Aue W. P., Roberts J. E., Glimcher M. J. et Griffin R. G.** (1984) Investigation of the mineral phases of bone by solid-state phosphorus-31 magic angle sample spinning nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 23, 6115-6120.
- Saito H., Tabeta R., Shoji A., Ozaki T., Ando I. et Miyata T.** (1984) A high-resolution ^{13}C -NMR study of collagenlike polypeptides and collagen fibrils in solid state studied by the cross-polarization-magic angle-spinning method. Manifestation of conformation-dependent ^{13}C chemical shifts and application to conformational characterization. *Biopolymers* 23, 2279-2297.
- Saito H. et Yokoi M.** (1992) A ^{13}C NMR study on collagens in the solid state: hydration/dehydration-induced conformational change of collagen and detection of internal motions. *Journal of Biochemistry* 111, 376-382.

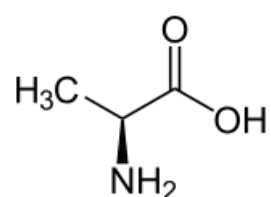
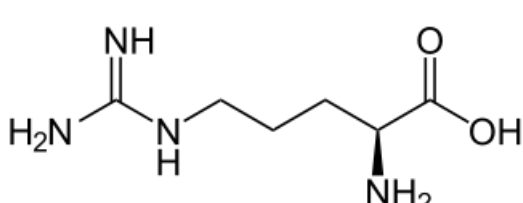
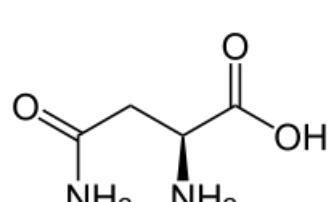
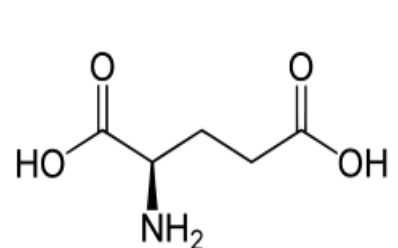
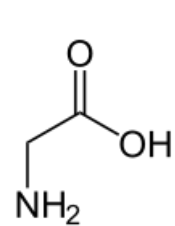
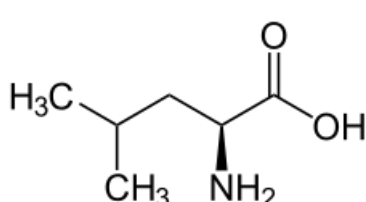
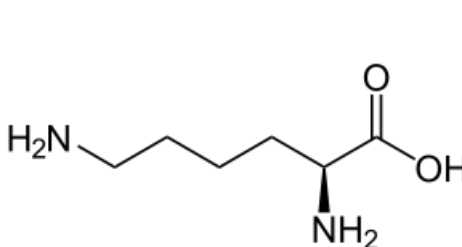
- Salesse K., Dufour E., Castex D., Veleminski P., Santos F., Kucharova H., Jun L. et Bruzek J.** (2013) Life history of the individuals buried in the St. Benedict cemetery (Prague, 15th-18th centuries): Insights from ^{14}C dating and stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$) analysis. *American Journal of Physical Anthropology* 151, 202-214.
- Saporta G.** (2006) *Probabilités, analyse des données et statistique*. Editions Technip, Paris.
- Saukko P. et Knight B.** (2004) The establishment of identity of human remains. In : *Knight's forensic pathology* (Saukko P. et Knight B., Eds.), pp 98-135, Arnold, London.
- Schwarcz H. P., Agur K. et Meadows L.** (2010) A new method for determination of postmortem interval: citrate content of bone. *Journal of Forensic Sciences* 55, 1516-1522.
- Silverstein R. M., Webster F. X. et Kiemle D. J.** (2007) *Identification spectrométrique de composés organiques*. De Boeck, Bruxelles.
- Sledzik P. S.** (1998) Forensic Taphonomy: Postmortem decomposition and decay. In : *Forensic Osteology: Advances in the identification of human remains* (Reichs K. J., Ed.), pp 109-119, Charles C. Thomas, Springfield.
- Sledzik P. S. et Micozzi M. S.** (1997) Autopsied, embalmed, and preserved human remains: distinguishing features in forensic and historic contexts. In : *Forensic taphonomy: The postmortem fate of human remains* (Haglund W. D. et Sorg M. H., Eds.), pp 483-495.
- Smernik R. J. et Oades J. M.** (2000) The use of spin counting for determining quantitation in solid state ^{13}C NMR spectra of natural organic matter. 2. HF-treated soil fractions. *Geoderma* 96, 159-171.
- Soubias O., Jolibois F., Réat V. et Milon A.** (2004) Understanding sterol-membrane interactions, part II: Complete ^1H and ^{13}C assignments by solid-state NMR spectroscopy and determination of the hydrogen-bonding partners of cholesterol in a lipid bilayer. *Chemistry - A European Journal* 10, 6005-6014.
- Sparks D. L., Oeltgen P. R., Kryscio R. J. et Hunsaker J. C.** (1989) Comparison of chemical methods for determining postmortem interval. *Journal of Forensic Sciences* 34, 197-206.
- Spencer H., Holtzman R. B., Kramer L. et Ilcewicz F. H.** (1977) Metabolic balances of ^{210}Pb and ^{210}Po at natural levels. *Radiation Research* 69, 166-184.
- Stevenson F. J.** (1982) *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. Wiley, New York.
- Swift B.** (2006) The timing of death. In : *Essentials of autopsy practice* (Rutty G. N., Ed.), Springer, Berlin.
- Swift B., Lauder I., Black S. et Norris J.** (2001) An estimation of the post-mortem interval in human skeletal remains: a radionuclide and trace element approach. *Forensic Science International* 117, 73-87.
- Taylor R. E., Suchey J. M., Payen L. A. et Slota P. J.** (1989) The use of radiocarbon (^{14}C) to identify human skeletal materials of forensic science interest. *Journal of Forensic Sciences* 34, 1196-1205.
- Thomas T., Martin A. et Lafage-Proust M.-H.** (2011) Physiologie du tissu osseux. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* 27-025-A-20, 1-17.
- Turner-Walker G.** (2008) The chemical and micro degradation of bones and teeth. In ; *Advances in Human palaeopathology* (Pinhasi R. et Mays S., Eds.), pp 3-29, Wiley & Sons, Chicester.

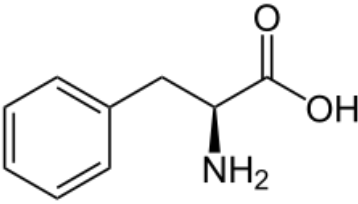
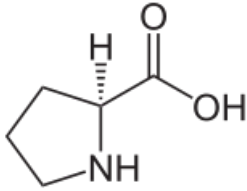
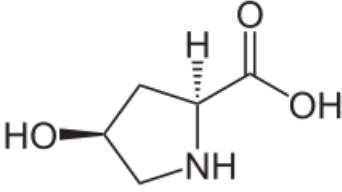
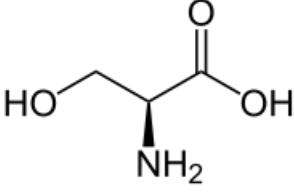
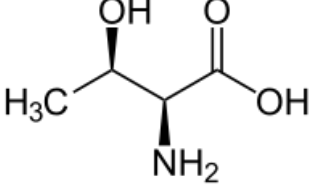
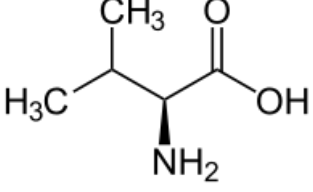
- Turner-Walker G. et Peacock E. E.** (2008) Preliminary results of bone diagenesis in Scandinavian bogs. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 266, 151-159.
- Ubelaker D. H.** (2001) Artificial radiocarbon as an indicator of recent origin of organic remains in forensic cases. *Journal of Forensic Sciences* 46, 1285-1287.
- Ubelaker D. H., Buchholz B. A. et Stewart J. E. B.** (2006) Analysis of artificial radiocarbon in different skeletal and dental tissue types to evaluate date of death. *Journal of Forensic Sciences* 51, 484-488.
- Ubelaker D. H. et Parra R. C.** (2011) Radiocarbon analysis of dental enamel and bone to evaluate date of birth and death: Perspective from the southern hemisphere. *Forensic Science International* 208, 103-107.
- van der Plicht J., van der Sanden W. A. B., Aerts A. T. et Streurman H. J.** (2004) Dating bog bodies by means of ^{14}C -AMS. *Journal of Archaeological Science* 31, 471-491.
- van Klinken G. J.** (1999) bone collagen quality indicators for palaeodietary and radiocarbon measurements. *Journal of Archaeological Science* 26, 687-695.
- Van Sint Jan S. et Rooze M.** (1992) The thenar muscles: New findings. *Surgical and Radiologic Anatomy* 14, 325-329.
- Vass A. A., Bass W. M., Wolt J. D., Foss J. E. et Ammons J. T.** (1992) Time since death determinations of human cadavers using soil solution. *Journal of Forensic Sciences* 37, 1236-1253.
- Vergès E.** (2009) Éthique et déontologie de la recherche scientifique. In : *Qu'en est-il du droit de la recherche ?* (Larrieu J., Ed.), p 131, Presse de l'Université de Toulouse 1 Capitole, Toulouse.
- vonEndt D. W. et Ortner D. J.** (1984) Experimental effects of bone size and temperature on bone diagenesis. *Journal of Archaeological Science* 11, 247-253.
- Weiner S. et Wagner H. D.** (1998) The material bone: Structure-Mechanical function relations. *Annual Review of Materials Science* 28, 271-298.
- Weitzel M. A.** (2005) A report of decomposition rates of a special burial type in Edmonton, Alberta from an experimental field study. *Journal of Forensic Sciences* 50.
- Werbrouck A., Manaouil C., Jarde O. et Foulon P.** (2008) Le don du corps à la science. *La revue du praticien* 58, 253-257.
- White T. D. et Folkens P. A.** (2005) *The Human Bone Manual*. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Willerslev E. et Cooper A.** (2005) Ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society B* 272, 3-16.
- Wilson E. E., Awonusi A., Morris M. D., Kohn D. H. et Tecklenburg M. M. J.** (2006) Three structural roles for water in bone observed by solid-state NMR. *Biophysical Journal* 90, 3722-3731.
- Wise E. R., Maltsev S., Davies M. E., Duer M. J., Jaeger C., Loveridge N., Murray R. C. et Reid D. G.** (2007) The organic-mineral interface in bone is predominantly polysaccharide. *Chemistry of Materials* 19, 5055-5057.
- Wishart D. S., Bigam C. G., Holm A., Hodges R. S. et Sykes B. D.** (1995) ^1H , ^{13}C , ^{15}N random coil NMR chemical shifts of the common aminoacid. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *Journal of Biomolecular NMR* 5, 67-81.

- Wu Y., Ackerman J. L., Kim H.-M., Rey C., Barroug A. et Glimcher M. J.** (2002) Nuclear magnetic resonance spin-spin relaxation of the crystals of bone, dental enamel, and synthetic hydroxyapatites. *Journal of Bone and Mineral Research* 17, 472-480.
- Yamanobe T. et Kurosu H.** (1998) Polyethylene and paraffins. In : *Solid State NMR of Polymers* (Ando I. et Asakura T., Eds.), pp 327-350, Elsevier, Amsterdam.
- Yeung D. K. W., Lam S. L., Griffith J. F., Chan A. B. W., Chen Z., Tsang P. H. et Leung P. C.** (2008) Analysis of bone marrow fatty acid composition using high-resolution proton NMR spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids* 151, 103-109.
- Zazzo A. et Saliège J.-F.** (2011) Radiocarbon dating of biological apatites: A review. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 310, 52-61.
- Zhang M., Haga A., Sekiguchi H. et Hirano S.** (2000) Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkform (*Bombyx mori*) pupa exuvia. *International Journal of Biological Macromolecules* 27, 99-105.
- Zhu P., Xu J., Sahar N., Morris M. D., Kohn D. H. et Ramamoorthy A.** (2009) Time-resolved dehydration-induced structural changes in an intact bovine cortical bone revealed by solid-state NMR spectroscopy. *Journal of American Chemical Society* 131, 17064-17065.
- Ziad N., Zarki R., Benmansour M., Sayerh T. et Laissaoui A.** (2012) Determination of ^{210}Pb in human skeletal remains from Morocco: implications for time since death assessment. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 292, 315-319.
- Zwanziger H.** (1989) The multielemental analysis of bone. *Biological Trace Element Research* 19, 195-232.

ANNEXES

Annexe 1 – Formules chimiques brute et semi développée des principaux acides aminés retrouvés dans le collagène osseux

Alanine Ala – A	C₃H₇NO₂	
Arginine Arg – R	C₆H₁₄N₄O₂	
Asparagine Asn – N	C₄H₈N₂O₃	
Acide Glutamique Glu – E	C₅H₉NO₄	
Glycine Gly – G	C₂H₅NO₂	
Leucine Leu – L	C₆H₁₃NO₂	
Lysine Lys – K	C₆H₁₄N₂O₂	
Phénylalanine Phe – F	C₉H₁₁NO₂	

		
Proline Pro – P	$C_5H_9NO_2$	
Hydroxyproline	$C_5H_9NO_3$	
Sérine Ser – S	$C_3H_7NO_3$	
Thréonine Thr – T	$C_4H_9NO_3$	
Valine Val – V	$C_5H_{11}NO_2$	

Annexe 2 – Notice d'information et formulaire concernant le don de corps à la science à la faculté de médecine de l'Université de Tours

ASSOCIATION DES DONS DU CORPS

Tours, le

Madame, Monsieur,

Je vous remercie de votre généreuse intention de faire don de votre corps au Laboratoire d'Anatomie de la Faculté de Médecine de Tours. Le Laboratoire d'Anatomie a besoin du concours de tous ceux qui, comme vous, aident la recherche scientifique et la formation des futurs médecins et chirurgiens.

Nous vous engageons vivement à prévenir vos proches de votre décision et des informations qui sont contenues dans ce courrier.

Vous trouverez ci-joint un **modèle de demande d'inscription** que vous devrez **recopier dater et signer de votre main en 2 exemplaires**. Il est indispensable **que vous recopiez et non que vous remplissiez** cette demande d'inscription.

Dès réception, votre dossier sera enregistré et nous vous adresserons les documents suivants :

1. **Un exemplaire visé par nos services de votre déclaration manuscrite**. Vous devrez le conserver sous enveloppe avec la mention « ceci représente mes dernières volontés », dans votre livret de famille ou le confier à toute personne (parent ou ami) chargée d'exécuter vos dernières volontés.
2. **Une carte de donateur** que vous devrez conserver en permanence avec vos papiers d'identité. Sans ce document au moment du décès le don de corps ne peut avoir lieu. En cas de perte ou de vol, nous vous en délivrerons gratuitement une copie sur demande.
3. **Une fiche à insérer dans votre livret de famille** qui indique à vos proches les formalités pratiques à accomplir au moment du décès.

Au moment du décès, la personne qui ouvrira cette enveloppe ou trouvera votre carte de donateur devra se mettre au plus vite en relation téléphonique avec notre secrétariat au **02.47.36.60.40** ou à défaut **02 47 36 60 39** (7 jours sur 7, 24h/24). Le transport du corps doit être achevé dans un délai maximum de 48h à compter du décès. Passé ce délai, le don du corps ne peut plus être effectué.

Après réalisation des travaux de recherche, le corps du donateur est crématisé. Il peut aussi être complètement ou partiellement conservé anonymement pour une durée limitée à des fins scientifiques ou pédagogiques. Les cendres ne sont pas restituées à la famille mais dispersées anonymement au Jardin du Souvenir de Tours sud réservé aux donateurs. Une stèle en hommage aux donateurs, sans aucune inscription nominative, permet aux proches de s'y recueillir. Si telle est votre volonté, votre famille peut mentionner votre geste sur le caveau familial (par exemple : « **A la mémoire de Jean DUPONT (1920-2012) - selon sa volonté, son corps a été remis à la science** »)

Périodiquement, l'association organise, pour les familles, une cérémonie d'hommage à la mémoire des donateurs décédés lors des mois précédents.

10, boulevard Tonnellé – 37032 TOURS Cedex
Téléphone : 02 47 36 60 40 – 02 47 36 60 39 – **Fax** : 02 47 36 62 07
dons.corps@med.univ-tours.fr <http://dons.corps.med.univ-tours.fr/>

L'association prend en charge l'organisation du transport du corps du donateur, de sa crémation, de la dispersion des cendres et des cérémonies d'hommages. Toutefois, elle ne dispose d'aucune ressource propre et est contrainte de demander aux donateurs une participation forfaitaire fixée en assemblée générale. Au 1^{er} février 2013, elle s'élèvera à 1150 euros.

Pour couvrir cette contribution, les donateurs devront impérativement souscrire une assurance en cas de décès au bénéfice de l'Association permettant de couvrir le montant de la participation demandée au moment du décès. Celle-ci doit vous permettre l'ouverture d'un contrat d'épargne obsèques alimenté par vos soins pour un montant minimal correspondant à la contribution nécessaire aux opérations de crémation. Les sommes figurant sur ce compte seront, au moment de votre décès, versées à l'Association. Toutefois, en cas d'annulation de votre don du corps, la possibilité doit vous être laissée de retrouver la libre disposition des sommes versées.

Pour ce faire, vous pouvez :

- soit vous rapprocher de votre organisme assureur habituel afin qu'il vous propose une garantie en ce sens,
- soit opter pour la garantie spécifique proposée par la Mutuelle MUTAC, mutuelle soumise aux dispositions du livre II du code de la mutualité, spécialisée dans la prévoyance obsèques, l'assurance obsèques et l'assurance décès.

Cette mutuelle spécialisée en prévoyance obsèques, est parfaitement susceptible de répondre à la couverture spécifique des frais de traitement du corps donné à la Science. L'Association s'est assurée qu'elle vous réserve le meilleur accueil.

En application d'une convention d'indication conclue entre Mutac et l'Association, vos coordonnées seront, sauf opposition de votre part formulée sur la demande d'inscription ci-joint, transmises à la *MUTAC* qui vous contactera pour la mise en place d'un contrat de prévoyance obsèques selon les modalités et conditions qu'elle vous décrira.

**Votre inscription à l'association du don du corps ne sera effective
qu'une fois réceptionné un document attestant de la souscription d'une assurance décès
auprès de Mutac ou d'un autre organisme**

Nous restons à votre disposition pour vous donner tous renseignements complémentaires et vous prions d'agréer, Madame, Monsieur, l'expression de notre parfaite considération.



Professeur Christophe DESTRIEUX
Président de l'Association du Don de Corps du Centre Ouest

P.S. : Vous pouvez à tout moment revenir sur votre décision, en nous retournant, barrée, votre carte portant la mention « *annulée le* » et signée

COUPON REPONSE A RETOURNER
A

L'Association des Dons du Corps – 10 Boulevard Tonnellé – 37032 TOURS Cedex

Je soussigné(e), ☐* Mademoiselle ☐* Madame ☐* Monsieur

**Cochez la case*

Nom : _____ Prénom : _____

Date de naissance : _____

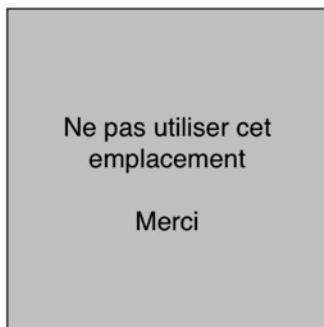
Adresse : _____

Code postal : _____ Ville : _____

N° de Téléphone : _____

☐ J'accepte de recevoir un dossier de la part de MUTAC

Signature :



Modèle de demande d'inscription
Recopier ce document de votre main,
en deux exemplaires, le dater et le signer

(Articles R-2213-3 et suivants du code général
des collectivités territoriales))

Utiliser uniquement comme modèle
Ne pas compléter
Ne pas nous retourner

A retourner à : Dons du Corps
 Faculté de Médecine
 10, boulevard Tonnelé
 37032 TOURS Cedex

Je soussigné(e), (nom d'épouse et nom de jeune fille et prénom en lettres majuscules)

né(e) le..... à.....

domicilié(e) à

déclare faire don de mon corps, à mon décès, au laboratoire d'Anatomie de la Faculté de Médecine de Tours. J'accepte que mes restes soient incinérés (et mes cendres alors dispersées anonymement au Jardin du Souvenir du Cimetière de Tours Sud), ou conservés à des fins pédagogiques ou scientifiques.

Je m'engage à souscrire une garantie obsèques pour que la participation au fonctionnement de l'Association du don de corps soit honorée à mon décès : la compagnie est.....(1)

J'ai bien compris :

- que mon inscription au don de corps ne sera effective qu'une fois que j'aurais justifié de l'ouverture d'un compte obsèques ou d'une assurance décès.
- qu'au moment de mon décès, ma succession devra prendre en charge une différence éventuelle entre la participation demandée par l'Association à cette date et les sommes versées sur mon compte obsèques / assurance augmentées des intérêts.

Je demande, dès constatation de mon décès, d'informer le service des Dons du Corps - tél.: 02.47.36.60.40 ⁽²⁾ (7 jours sur 7). Au cas où mon décès aurait lieu en dehors de ma région, je déclare léguer mon corps à la Faculté de Médecine la plus proche, si celle-ci l'accepte.

Antécédents médicaux et chirurgicaux :.....

Fait à le.....

Signature

TSP

Notes

(1) Indiquer ici la compagnie choisie

- *auprès de la MUTAC, mutuelle spécialisée dans les garanties obsèques et qui propose une assurance sur-mesure pour la couverture de la garantie nécessaire à mon adhésion à l'Association. J'autorise l'Association du don du corps à communiquer mes coordonnées à MUTAC qui me contactera*

Ou

- *auprès de la compagnie XXX, contrat d'assurance décès ou de garantie obsèques (n°.....). (Joindre obligatoirement une copie de votre contrat au profit de l'Association)*

Demande à la compagnie que l'Association des Dons du corps, soit le 1^{er} bénéficiaire du contrat (à hauteur minimum de la facture de 1150€ et que le reste du capital souscrit sera à la personne de votre choix ou à défaut les héritiers.

(2) Le week-end et les jours fériés, un répondeur indiquera à votre correspondant les coordonnées de l'ambulancier chargé du transfert du corps du donateur vers la Faculté de Médecine de Tours.

Avant de nous retourner votre dossier, merci de vérifier les points suivants :

- ☐ Vous avez recopié à la main le modèle de demande d'inscription en 2 exemplaires

Attention ! Seules les copies manuscrites sont valides
 Les photocopies ne sont pas admises
 Il est inutile de nous retourner le modèle de demande d'inscription
 Joindre la copie de votre contrat d'assurance au profit de l'Association

- ☐ Pensez à prévenir vos proches de votre décision

Même si cette démarche n'est, bien évidemment, pas obligatoire, nous vous engageons fortement à prévenir vos proches de votre démarche afin qu'ils ne soient pas surpris au moment de votre décès.

Merci de votre aide.

Annexe 3 – Notice d'information concernant le don de corps à la science à la faculté de médecine de l'Université d'Aix-Marseille



LE DON DE CORPS A LA SCIENCE

Il s'agit d'un don pour l'enseignement et la recherche en médecine et non d'un don d'organes.

Le don du corps est une démarche personnelle, volontaire, soumise à certaines dispositions, que toute personne majeure et capable peut faire de son vivant. Les dons provenant de personnes mineures ou sous tutelle sont interdits. Avant de faire votre demande, veuillez prendre connaissance des informations concernant ce don.

Vous trouverez ci-dessous la procédure pour faire don de son corps à la Faculté de Médecine de Marseille.

■ Première phase : demande manuscrite

Le donateur doit manifester explicitement sa décision de son vivant. Il en fait la déclaration écrite, rédigée de sa main et l'adresse par courrier simple (non recommandé), en joignant une enveloppe timbrée portant ses nom et adresse, au [Service Commun des Corps Donnés à la Science \(SCDS\) - Faculté de Médecine - 27, bd Jean Moulin - 13385 MARSEILLE cedex 5](#)

Le Service Commun des Corps Donnés à la Science (service commun de l'Université d'Aix-Marseille) s'est fixé pour objectif de faciliter les dons de corps, sur le plan technique et humain, afin d'offrir à la Faculté de Médecine de Marseille des possibilités plus étendues d'enseignement et de recherche en médecine.

■ Deuxième phase : après réception de la demande manuscrite

Envoi par le Service Commun des Corps Donnés à la Science de documents d'informations et des formulaires à compléter et à signer (fiche de renseignements à compléter et fiche de confirmation de don)

■ Troisième phase : retour des documents complétés

Le donateur renverra au Service Commun des Corps Donnés à la Science :

- la fiche de renseignements complétée en capitales d'imprimerie
- la fiche de confirmation de don complétée en capitales d'imprimerie, avec signature précédée de la mention « lu et approuvé »
- 2 photographies couleurs récentes "format identité"
- la photographie recto/verso de sa carte d'identité ou passeport
- 1 enveloppe timbrée portant son nom et son adresse

■ Quatrième phase : enregistrement de l'inscription

- Inscription du donateur dans le fichier du Service Commun des Corps Donnés à la Science
- Une carte de donateur sera alors expédiée à l'intéressé.

Modèle de demande manuscrite

« Je soussigné(e)... (nom et prénom), né(e) le... à...; demeurant à (adresse), déclare faire don de mon corps à la science à mon décès et demande que celui-ci soit transféré à la faculté de médecine la plus proche du lieu de mon décès.

Cette décision, prise en toute connaissance de cause, sain(e) de corps et d'esprit, représente mes dernières volontés.

Fait à... le... (lieu et date)

(Signature)»

RÉPONSES AUX QUESTIONS LES PLUS FRÉQUEMMENT POSÉES

Qui peut faire don de son corps à la Science ?

Toute personne âgée de 18 ans et plus.

Que fait-on des corps à la Faculté de Médecine de Marseille ?

Il s'agit d'un don pour l'enseignement et la recherche en médecine et non d'un don d'organes.

Les corps sont embaumés puis utilisés :

- soit aux fins de recherches anatomiques, médicales et chirurgicales,
- soit pour l'enseignement de l'anatomie et de la chirurgie

Départements concernés par l'action de l'Université d'Aix-Marseille

- Bouches du Rhône
- Vaucluse
- Alpes de Haute Provence
- Var : tout le territoire situé à l'ouest d'une ligne allant du Lavandou jusqu'au Pont de l'Artuby
- Corse du Sud et Haute Corse : la Faculté accepte les dons de corps, mais ne peut assumer les frais de transport de la Corse à Marseille. Il faut prendre les dispositions financières nécessaires afin de régler les frais de transport de la distance Corse-Continent auprès de l'opérateur funéraire.

La famille ou les tiers ont-ils le droit de s'opposer au don de corps ?

La famille peut légitimement s'opposer à la cession du corps à une Faculté de Médecine.

Il est conseillé au donateur de prendre ses précautions pour que sa volonté soit respectée : avertir au préalable les siens, éventuellement charger un exécuteur testamentaire de la réalisation de ses volontés, ce dernier aura pour mission de régler la question au mieux des intérêts moraux du défunt, de la famille du défunt et de la Faculté.

Les tiers, autres que la famille, n'ont aucun droit moral reconnu sur le corps du donateur.

Existe-t-il des obstacles religieux ?

Aucun obstacle religieux réel ne s'oppose au don de corps en vue de l'enseignement et de la recherche médicale.

Que fait-on des corps après utilisation ?

Après les travaux de recherche, les corps des donateurs sont incinérés anonymement. Il n'y a pas de restitution des cendres aux familles.

Une plaque à la mémoire des donateurs se trouve au cimetière de Cabriès (13) afin que les familles qui le désirent puissent disposer d'un lieu de recueillement. Les cendres reposent au Jardin du Souvenir - carré 52 du cimetière Saint-Pierre à Marseille.

Comment doit-on procéder pour faire don de ses organes ?

La Faculté de Médecine de Marseille ne reçoit pas les dons d'organes en vue de greffes. Si vous souhaitez avoir des renseignements concernant ce don, vous pouvez vous adresser à : [Etablissement Français de Greffes - 5 rue Lacué - 75012 PARIS - Tél. 08 00 20 22 24](#)

Que faut-il faire en cas de changement d'adresse, changement de nom, renonciation ?

Toute modification concernant le donateur doit être signalée au Service Commun des Corps Donnés à la Science (SCCDS) par lettre simple.

Changement d'adresse

Le donateur informera le Service Commun des Corps Donnés à la Science :

- si le nouveau lieu de résidence est situé dans la région dépendant de la Faculté de Médecine de Marseille, un duplicata de la carte lui sera adressé ;
- si le nouveau lieu de résidence est situé dans une autre région que celle définie ci-dessus, le donateur doit entrer en relation avec l'Association de dons de corps ou la Faculté de Médecine la plus proche de son domicile pour éventuellement constituer un nouveau dossier (il n'y a pas de transfert de dossier d'une Faculté, Association ou Administration vers une autre). Adresses des autres Facultés de Médecine de France

Changement de nom

Le donateur informera le Service Commun des Corps Donnés à la Science : une nouvelle carte lui sera adressée (duplicata)

Renonciation

Le donateur informera le Service Commun des Corps Donnés à la Science par courrier et détruira ensuite la carte en sa possession.

DÉMARCHES À ACCOMPLIR LORS DU DÉCÈS D'UN DONATEUR

La gestion du Service Commun des Corps Donnés à la Science et la prise en charge des prestations de transport de corps lors du décès d'un donateur sont assurées par l'Université d'Aix-Marseille.

L'Université d'Aix-Marseille n'est pas un opérateur funéraire ; elle n'est pas habilitée à transporter les corps.

Dans tous les cas, après constatation du décès par le Médecin, la personne chargée des démarches réglementaires concernant le décès doit faire appel à l'opérateur funéraire agréé par l'Université, en précisant que l'Université d'Aix-Marseille remboursera uniquement les frais de transport des corps, à l'exclusion de toute autre prestation.

**N° vert de l'opérateur funéraire
0 800 005 917**

L'opérateur funéraire prendra contact avec le service compétent de la Faculté de Médecine de Marseille : le Service Commun des Corps Donnés à la Science (tél. 04 91 32 44 82)

Si le défunt avait demandé une cérémonie religieuse, l'opérateur funéraire devra en être informé et il appartiendra à la personne chargée de régler les démarches de prendre les dispositions en vue de cette cérémonie (cette prestation restant à la charge de la famille).

Le transport du corps doit être effectué dans les délais légaux. Les opérations de transport doivent être achevées dans un délai entre 6 heures et 48 heures à compter de l'heure du constat du décès par le médecin.

Lorsque le décès survient dans un établissement de santé public ou privé disposant d'équipements permettant la conservation du corps, le délai est porté à 48 heures.

Documents obligatoires

- l'original de la carte de donateur
- Le certificat de décès intégral avec cause du décès (photocopie acceptée)
- le certificat médical de non-contagion délivré après le décès
- le permis d'inhumer
- l'autorisation de transport
- la photocopie de la carte d'identité recto-verso ou des pages 2 et 3 du passeport
- l'acte de décès (un délai de 5 jours est accordé pour fournir l'acte de décès)

Cas de refus

Le corps du donateur peut être refusé pour les raisons suivantes :

- absence de la carte de donateur,
- autopsie, prélèvement d'organes autres que les yeux
- décès consécutif à un accident par arme à feu, arme blanche, noyade, mutilation accidentelle
- absence de certificat médical
- non respect du délai réglementaire

Décès en dehors de l'un des départements concernés par l'action de l'Université d'Aix-Marseille

Si le décès du donateur survient dans une localité ne dépendant pas de la Faculté de Médecine de Marseille, la personne chargée des démarches réglementaires doit prendre contact avec la Faculté de Médecine la plus proche du domicile, afin d'obtenir les renseignements nécessaires au transfert du corps vers la Faculté concernée par la zone du lieu de décès.

Annexe 4 – Masse analysée et facteur correctif de normalisation par la masse de tous les échantillons analysés pour les acquisitions en RMN du proton avant lyophilisation

Collection Simon (Genève, Suisse)

Identifiant	Masse analysée (mg)	Teneur en os ^a	Teneur en eau ^b	Masse sèche (mg) ^c	Facteur correctif ^d
Simon VAL-06	117,5	0,920	0,080	108,1	0,93
Simon TRE-11	121,4	0,902	0,098	109,5	0,91
Simon AIG-10	119,7	0,926	0,074	110,8	0,90
Simon AIG-43	120,3	0,923	0,077	111,0	0,90
Simon AIG-48	112,1	0,932	0,068	104,5	0,96

Total n = 5

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Collection Inrap Grand Est nord (Metz, France)

Identifiant	Masse analysée (mg)	Teneur en os ^a	Teneur en eau ^b	Masse sèche (mg) ^c	Facteur correctif ^d
Sorbey-1-1	116,1	0,938	0,062	108,9	0,92
Sorbey-1-3	92,1	0,947	0,053	87,2	1,15
Sorbey-1-4	115,7	0,938	0,062	108,5	0,92
Sorbey-1-5	130,0	0,933	0,067	121,3	0,82
MV-5	118,6	0,930	0,070	110,3	0,91
MV-6-1	112,3	0,932	0,068	104,7	0,96
MV-6-2	122,6	0,905	0,095	110,9	0,90
MV-6-3	117,8	0,909	0,091	107,1	0,93
MV-6-4	118,4	0,910	0,090	107,7	0,93
MV-13-1	138,8	0,934	0,066	129,6	0,77
MV-13-2	138,3	0,940	0,060	130,0	0,77
MV-13-3	136,6	0,932	0,068	127,3	0,79
MV-13-4	133,2	0,954	0,046	127,1	0,79
MV-13-5	118,7	0,941	0,059	111,7	0,90
MV-13-6	140,2	0,937	0,063	131,4	0,76
MV-13-7	126,7	0,946	0,054	119,9	0,83
MV-13-8	116,9	0,938	0,062	109,6	0,91
MV-13-9	127,4	0,939	0,061	119,6	0,84

Total n = 4 (18)

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Collection du Muséum National de Prague (République tchèque)

Identifiant	Masse analysée (mg)	Teneur en os ^a	Teneur en eau ^b	Masse sèche (mg) ^c	Facteur correctif ^d
PRG/91	148,2	0,950	0,050	140,8	0,71
PRG242/93	135,7	0,921	0,079	125,0	0,80
PRG343/94	130,1	0,909	0,091	118,3	0,85
PRG342/94	130,9	0,933	0,067	122,1	0,82
PRG596/95	151,6	0,935	0,065	141,7	0,71
PRG709/2001	133,7	0,944	0,056	126,2	0,79
PRG717/2003	133,5	0,913	0,087	121,9	0,82
PRG1116/2004	134,8	0,923	0,077	124,4	0,80
PRG827/2004	139,8	0,920	0,080	128,6	0,78
PRG518/2005	133,9	0,932	0,068	124,8	0,80
PRG567/2010	131,8	0,942	0,058	124,2	0,81
PRG1021/2010	127,2	0,941	0,059	119,7	0,84
Total n = 12					

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Collection de l'IRCGN (Rosny-sous-Bois, France)

Identifiant	Masse analysée (mg)	Teneur en os ^a	Teneur en eau ^b	Masse sèche (mg) ^c	Facteur correctif ^d
IRCGN-01	112,4	0,916	0,084	103,0	0,97
IRCGN-02	104,6	0,923	0,077	96,5	1,04
IRCGN-03	114,8	0,938	0,062	107,7	0,93
IRCGN-06	121,2	0,925	0,075	112,1	0,89
IRCGN-07	130,8	0,929	0,071	121,5	0,82
IRCGN-08	114,5	0,932	0,068	106,7	0,94
IRCGN-12	134,5	0,952	0,048	128,0	0,78
IRCGN-14	143,4	0,956	0,044	137,1	0,73
IRCGN-15	140,5	0,928	0,072	130,4	0,77
IRCGN-16	119,2	0,927	0,073	110,5	0,90
IRCGN-17	131,0	0,940	0,060	123,1	0,81
IRCGN-18	132,9	0,910	0,090	120,9	0,83
IRCGN-19	146,9	0,928	0,072	136,3	0,73
IRCGN-20	132,6	0,920	0,080	122,0	0,82
IRCGN-22	128,5	0,938	0,062	120,5	0,83
IRCGN-24	116,7	0,922	0,078	107,6	0,93
IRCGN-25	126,5	0,900	0,100	113,8	0,88
IRCGN-26	116,5	0,937	0,063	109,2	0,92
IRCGN-27	130,6	0,918	0,082	119,9	0,83
IRCGN-28	128,5	0,940	0,060	120,8	0,83
IRCGN-29	107,5	0,931	0,069	100,1	1,00
IRCGN-30	129,0	0,956	0,044	123,3	0,81
IRCGN-31	125,0	0,918	0,082	114,7	0,87
IRCGN-32	131,9	0,914	0,086	120,6	0,83
IRCGN-33	119,1	0,898	0,102	106,9	0,94
IRCGN-35	132,0	0,914	0,086	120,6	0,83
IRCGN-36	142,9	0,912	0,088	130,3	0,77
IRCGN-37	139,2	0,951	0,049	132,4	0,76
IRCGN-38	133,8	0,908	0,092	121,5	0,82
IRCGNc-#3/2002	135,3	0,936	0,064	126,6	0,79
IRCGNc-#4/2002	137,5	0,902	0,088	124,0	0,81
IRCGNc-#6/2003	135,4	0,956	0,044	129,4	0,77
IRCGNc-#2/2003	130,8	0,954	0,046	124,8	0,80
IRCGNc-#9/2002	129,8	0,933	0,067	121,1	0,83
Total n = 34					

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Collection de l'École de Chirurgie (Paris, France)

Identifiant	Masse analysée (mg)	Teneur en os ^a	Teneur en eau ^b	Masse sèche (mg) ^c	Facteur correctif ^d
EC12-2502	120,7	0,921	0,079	111,2	0,90
EC12-2693	125,6	0,933	0,067	117,2	0,85
EC12-2673	121,7	0,928	0,072	112,9	0,89
EC12-2652	123,7	0,936	0,064	115,8	0,86
Total n = 4					

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Collection du Laboratoire d'Anatomie de l'Université Libre de Bruxelles et collection de l'Institut royal des Sciences naturelles de Belgique (Bruxelles, Belgique)

Identifiant	Masse analysée (mg)	Teneur en os ^a	Teneur en eau ^b	Masse sèche (mg) ^c	Facteur correctif ^d
BRUCHAT-2	127,5	0,928	0,072	118,3	0,85
BRUCHAT-4	131,8	0,932	0,068	122,8	0,81
BRUCHAT-13	151,1	0,920	0,080	139,0	0,72
BRUMANAGE	124,1	0,906	0,094	112,4	0,89
BRUULB-1	113,3	0,899	0,101	101,9	0,98
BRUULB-2	148,8	0,917	0,083	136,4	0,73
BRUULB-3	126,0	0,910	0,090	114,7	0,87
BRUULB-4	116,4	0,955	0,045	111,2	0,90
BRUULB-5	136,3	0,914	0,086	124,6	0,80
BRUULB-6	141,0	0,956	0,044	134,8	0,74
BRUULB-8	129,1	0,912	0,088	117,7	0,85
BRUULB-9	137,4	0,909	0,081	124,9	0,80
BRUULB-10	148,5	0,920	0,080	136,6	0,73
BRUULB-11	129,2	0,913	0,087	118,0	0,85
BRUULB-12	143,4	0,899	0,101	128,9	0,78
BRUULB-14	127,4	0,957	0,043	121,9	0,82
BRUULB-18	129,7	0,906	0,094	117,5	0,85
BRUULB-19	136,4	0,909	0,091	124,0	0,81
BRUULB-20	122,4	0,908	0,092	111,1	0,90
BRUULB-44	136,9	0,952	0,048	130,3	0,77
Total n = 20					

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Collection de Milan (Italie)

Identifiant	Masse analysée (mg)	Teneur en os ^a	Teneur en eau ^b	Masse sèche (mg) ^c	Facteur correctif ^d
MIL-19-L4R	129,2	0,919	0,081	118,7	0,84
MIL-33-L5R	109,9	0,897	0,103	98,6	1,01
MIL-39-L6R	126,6	0,904	0,096	114,4	0,87
MIL-55-L9R	122,9	0,907	0,093	111,5	0,90
MIL-62-L8R	118,8	0,914	0,086	108,6	0,92
MIL-1	111,8	0,916	0,084	102,4	0,98
MIL-9	120,6	0,918	0,082	110,7	0,90
MIL-12	117,0	0,919	0,081	107,5	0,93
MIL-15	110,6	0,910	0,090	100,6	0,99
MIL-56	118,9	0,910	0,090	108,2	0,92
MIL-41	125,4	0,915	0,085	114,7	0,87
MIL-47	121,5	0,915	0,085	111,2	0,90
MIL-70	114,4	0,903	0,097	103,3	0,97
MIL-85	118,5	0,910	0,090	107,8	0,93
MIL-94	114,9	0,906	0,094	104,1	0,96
MIL-L1F	134,5	0,889	0,111	119,6	0,84
Total n = 16					

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Os d'intérêt archéologique

Identifiant	Masse analysée	Teneur en	Teneur en	Masse sèche	Facteur
-------------	----------------	-----------	-----------	-------------	---------

	(mg)	os ^a	eau ^b	(mg) ^c	correctif ^d
SB3	122,4	0,941	0,059	115,2	0,87
SSPM3	114	0,939	0,061	107,0	0,93
LYON-03	134,7	0,954	0,046	128,5	0,78
Total n = 3					

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Collection d'os animal (*Sus scrofa*)

Identifiant	Masse analysée (mg)	Teneur en os ^a	Teneur en eau ^b	Masse sèche (mg) ^c	Facteur correctif ^d
SAterre12	117,3	0,932	0,068	109,3	0,91
SAairair12	134,5	0,915	0,085	123,1	0,81
SAairsol12	143,1	0,876	0,124	125,4	0,80
VAL12-11-22	122,7	0,885	0,115	108,6	0,92
SAterre13	132,9	0,890	0,110	118,3	0,85
SAairair13	140,4	0,886	0,114	124,4	0,80
SAairsol13	157,6	0,922	0,078	145,3	0,69
Total n = 7					

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Annexe 5 – Masse analysée et facteur correctif de normalisation par la masse de tous les échantillons analysés pour les acquisitions en RMN du proton après lyophilisation

Collection Simon (Genève, Suisse)

Identifiant	Masse sèche (mg)	Facteur correctif ^a
Simon VAL-06	123,4	0,81
Simon TRE-11	117,5	0,85
Simon AIG-10	90,4	1,11
Simon AIG-43	116,9	0,86
Simon AIG-48	117,3	0,85
Total n = 5		

^a Rapport entre 100 et la masse sèche analysée. Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Collection Inrap Grand Est nord (Metz, France)

Identifiant	Masse sèche (mg)	Facteur correctif ^a
Sorbey-1-1	116,4	0,86
Sorbey-1-3	47,6	2,10
Sorbey-1-4	122,4	0,82
Sorbey-1-5	127,8	0,78
MV-5	120,9	0,83
MV-6-1	110,4	0,91
MV-6-2	124,3	0,80
MV-6-3	117,2	0,85
MV-6-4	115,2	0,87
MV-13-1	135,3	0,74
MV-13-2	120,1	0,83
MV-13-3	131,0	0,76
MV-13-4	131,3	0,76
MV-13-5	113,8	0,88
MV-13-6	131,6	0,76
MV-13-7	119,6	0,84
MV-13-8	110,5	0,90
MV-13-9	126,0	0,79
Total n = 4 (18)		

^a Rapport entre 100 et la masse sèche analysée. Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Collection du Muséum National de Prague (République tchèque)

Identifiant	Masse sèche (mg)	Facteur correctif ^a
PRG/91	118,6	0,84
PRG242/93	126,7	0,79
PRG343/94	129,9	0,77
PRG342/94	128,1	0,78
PRG596/95	136,2	0,73
PRG709/2001	124,4	0,80
PRG717/2003	131,1	0,76
PRG1116/2004	136,9	0,73
PRG827/2004	133,3	0,75
PRG518/2005	126,8	0,79
PRG567/2010	127,0	0,79
PRG1021/2010	131,8	0,76
Total n = 12		

^a Rapport entre 100 et la masse sèche analysée. Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Collection de l'IRCGN (Rosny-sous-Bois, France)

Identifiant	Masse sèche (mg)	Facteur correctif^a
IRCGN-01	115,3	0,87
IRCGN-02	110,1	0,91
IRCGN-03	116,7	0,86
IRCGN-06	120,2	0,83
IRCGN-07	134,6	0,74
IRCGN-08	118,9	0,84
IRCGN-12	128,3	0,78
IRCGN-14	136,4	0,73
IRCGN-15	129,3	0,77
IRCGN-16	114,7	0,87
IRCGN-17	121,1	0,83
IRCGN-18	131,2	0,76
IRCGN-19	147,9	0,68
IRCGN-20	123,9	0,81
IRCGN-22	135,8	0,74
IRCGN-24	118,6	0,84
IRCGN-25	138,2	0,72
IRCGN-26	116,9	0,86
IRCGN-27	127,1	0,79
IRCGN-28	128,0	0,78
IRCGN-29	99,9	1,00
IRCGN-30	127,2	0,79
IRCGN-31	122,9	0,81
IRCGN-32	132,2	0,76
IRCGN-33	119,9	0,83
IRCGN-35	130,4	0,77
IRCGN-36	134,8	0,74
IRCGN-37	134,3	0,74
IRCGN-38	131,9	0,76
IRCGNc-#3/2002	128,3	0,78
IRCGNc-#4/2002	123,5	0,81
IRCGNc-#6/2003	137,3	0,73
IRCGNc-#2/2003	132,4	0,76
IRCGNc-#9/2002	124,5	0,80
Total n = 34		

^a Rapport entre 100 et la masse sèche analysée. Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Collection de l'École de Chirurgie (Paris, France)

Identifiant	Masse sèche (mg)	Facteur correctif^a
EC12-2502	112,5	0,89
EC12-2693	123,6	0,81
EC12-2673	125,4	0,80
EC12-2652	120,0	0,83
Total n = 4		

^a Rapport entre 100 et la masse sèche analysée. Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Collection du Laboratoire d'Anatomie de l'Université Libre de Bruxelles et collection de l'Institut royal des Sciences naturelles de Belgique (Bruxelles, Belgique)

Identifiant	Masse sèche (mg)	Facteur correctif ^a
BRUCHAT-2	123,1	0,81
BRUCHAT-4	108,0	0,93
BRUCHAT-13	139,9	0,71
BRUMANAGE	122,8	0,81
BRUULB-1	132,3	0,76
BRUULB-2	147,4	0,68
BRUULB-3	126,6	0,79
BRUULB-4	117,7	0,85
BRUULB-5	138,4	0,72
BRUULB-6	138,7	0,72
BRUULB-8	126,2	0,79
BRUULB-9	131,5	0,76
BRUULB-10	147,7	0,68
BRUULB-11	123,8	0,81
BRUULB-12	144,0	0,69
BRUULB-14	130,9	0,76
BRUULB-18	133,1	0,75
BRUULB-19	136,9	0,73
BRUULB-20	118,0	0,85
BRUULB-44	133,5	0,75
Total n = 20		

^a Rapport entre 100 et la masse sèche analysée. Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Collection de Milan (Italie)

Identifiant	Masse sèche (mg)	Facteur correctif ^a
MIL-19-L4R	129,6	0,77
MIL-33-L5R	115,4	0,87
MIL-39-L6R	119,3	0,84
MIL-55-L9R	117,3	0,85
MIL-62-L8R	121,1	0,83
MIL-1	111,7	0,90
MIL-9	118,2	0,85
MIL-12	119,1	0,84
MIL-15	115,6	0,87
MIL-56	115,0	0,87
MIL-41	131,3	0,76
MIL-47	115,7	0,86
MIL-70	115,0	0,87
MIL-85	116,3	0,86
MIL-94	117,6	0,85
MIL-L1F	136,8	0,73
Total n = 16		

^a Rapport entre 100 et la masse sèche analysée. Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Os d'intérêt archéologique

Identifiant	Masse sèche (mg)	Facteur correctif^a
SB3	100,5	1,00
SSPM3	115,8	0,86
LYON-03	126,2	0,79
Total n = 3		

^a Rapport entre 100 et la masse sèche analysée. Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Collection d'os animal (*Sus scrofa*)

Identifiant	Masse sèche (mg)	Facteur correctif^a
SAterre12	109,9	0,91
SAairair12	113,7	0,88
SAairsol12	128,8	0,78
VAL12-11-22	130,3	0,77
SAterre13	130,8	0,76
SAairair13	143,6	0,70
SAairsol13	150,6	0,66
Total n = 7		

^a Rapport entre 100 et la masse sèche analysée. Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Annexe 6 – Masse analysée et facteur correctif de normalisation par la masse de tous les échantillons analysés pour les acquisitions en RMN du carbone-13

Collection Simon (Genève, Suisse)

Identifiant	Masse analysée (mg)	Teneur en os ^a	Teneur en eau ^b	Masse sèche (mg) ^c	Facteur correctif ^d
Simon VAL-06	117,5	0,920	0,080	108,1	0,93
Simon TRE-11	121,4	0,902	0,098	109,5	0,91
Simon AIG-10	125,8	0,926	0,074	116,5	0,86
Simon AIG-43	120,3	0,923	0,077	111,0	0,90
Simon AIG-48	112,1	0,932	0,068	104,5	0,96
Total n = 5					

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Collection Inrap Grand Est nord (Metz, France)

Identifiant	Masse analysée (mg)	Teneur en os ^a	Teneur en eau ^b	Masse sèche (mg) ^c	Facteur correctif ^d
Sorbey-1-1	111,4	0,938	0,062	104,5	0,96
Sorbey-1-3	127,8	0,947	0,053	121,0	0,83
Sorbey-1-4	124,0	0,938	0,062	116,3	0,86
Sorbey-1-5	126,9	0,933	0,067	118,4	0,84
MV-5	118,6	0,930	0,070	110,3	0,91
MV-6-1	112,3	0,932	0,068	104,7	0,96
MV-6-2	122,6	0,905	0,095	110,9	0,90
MV-6-3	117,8	0,909	0,091	107,1	0,93
MV-6-4	118,4	0,910	0,090	107,7	0,93
MV-13-1	142,5	0,934	0,066	133,1	0,75
MV-13-2	138,3	0,940	0,060	130,0	0,77
MV-13-3	136,6	0,932	0,068	127,3	0,79
MV-13-4	133,2	0,954	0,046	127,1	0,79
MV-13-5	115,7	0,941	0,059	108,9	0,92
MV-13-6	140,2	0,937	0,063	131,4	0,76
MV-13-7	126,7	0,946	0,054	119,9	0,83
MV-13-8	116,9	0,938	0,062	109,6	0,91
MV-13-9	127,4	0,939	0,061	119,6	0,84
Total n = 4 (18)					

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Collection du Muséum National de Prague (République tchèque)

Identifiant	Masse analysée (mg)	Teneur en os ^a	Teneur en eau ^b	Masse sèche (mg) ^c	Facteur correctif ^d
PRG/91	148,2	0,950	0,050	140,8	0,71
PRG242/93	135,7	0,921	0,079	125,0	0,80
PRG343/94	130,1	0,909	0,091	118,3	0,85
PRG342/94	130,9	0,933	0,067	122,1	0,82
PRG596/95	151,6	0,935	0,065	141,7	0,71
PRG709/2001	133,7	0,944	0,056	126,2	0,79
PRG717/2003	133,5	0,913	0,087	121,9	0,82
PRG1116/2004	134,8	0,923	0,077	124,4	0,80
PRG827/2004	139,8	0,920	0,080	128,6	0,78
PRG518/2005	133,9	0,932	0,068	124,8	0,80
PRG567/2010	131,8	0,942	0,058	124,2	0,81
PRG1021/2010	127,2	0,941	0,059	119,7	0,84
Total n = 12					

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Collection de l'IRCGN (Rosny-sous-Bois, France)

Identifiant	Masse analysée (mg)	Teneur en os ^a	Teneur en eau ^b	Masse sèche (mg) ^c	Facteur correctif ^d
IRCGN-01	112,3	0,916	0,084	102,9	0,97
IRCGN-02	107,6	0,903	0,097	97,2	1,03
IRCGN-03	122,1	0,938	0,062	114,5	0,87
IRCGN-06	122,5	0,925	0,075	133,3	0,88
IRCGN-07	130,7	0,929	0,071	121,4	0,82
IRCGN-08	116,7	0,932	0,068	108,8	0,92
IRCGN-12	134,5	0,952	0,048	128,0	0,78
IRCGN-14	143,4	0,956	0,044	137,1	0,73
IRCGN-15	140,5	0,928	0,072	130,4	0,77
IRCGN-16	123,6	0,927	0,073	114,6	0,87
IRCGN-17	131,0	0,940	0,060	123,1	0,81
IRCGN-18	129,2	0,910	0,090	117,6	0,85
IRCGN-19	146,9	0,928	0,072	136,3	0,73
IRCGN-20	132,6	0,920	0,080	122,0	0,82
IRCGN-22	128,5	0,938	0,062	120,5	0,83
IRCGN-24	116,7	0,922	0,078	107,6	0,93
IRCGN-25	126,5	0,900	0,100	113,8	0,88
IRCGN-26	116,5	0,937	0,063	109,2	0,92
IRCGN-27	130,6	0,918	0,082	119,9	0,83
IRCGN-28	128,5	0,940	0,060	120,8	0,83
IRCGN-29	107,5	0,931	0,069	100,1	1,00
IRCGN-30	129,0	0,956	0,044	123,3	0,81
IRCGN-31	125,0	0,918	0,082	114,7	0,87
IRCGN-32	131,9	0,914	0,086	120,6	0,83
IRCGN-33	119,1	0,898	0,102	106,9	0,94
IRCGN-35	132,0	0,914	0,086	120,6	0,83
IRCGN-36	142,9	0,912	0,088	130,3	0,77
IRCGN-37	139,2	0,951	0,049	132,4	0,76
IRCGN-38	133,8	0,908	0,092	121,5	0,82
IRCGNc-#3/2002	135,3	0,936	0,064	126,6	0,79
IRCGNc-#4/2002	137,5	0,902	0,088	124,0	0,81
IRCGNc-#6/2003	135,4	0,956	0,044	129,4	0,77
IRCGNc-#2/2003	130,8	0,954	0,046	124,8	0,80
IRCGNc-#9/2002	129,8	0,933	0,067	121,1	0,83
Total n = 34					

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Collection de l'École de Chirurgie (Paris, France)

Identifiant	Masse analysée (mg)	Teneur en os ^a	Teneur en eau ^b	Masse sèche (mg) ^c	Facteur correctif ^d
EC12-2502	118,9	0,921	0,079	109,5	0,91
EC12-2693	128,2	0,925	0,075	118,6	0,84
EC12-2673	126,0	0,928	0,072	116,9	0,86
EC12-2652	122,6	0,922	0,078	113,0	0,88
Total n = 4					

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Collection du Laboratoire d'Anatomie de l'Université Libre de Bruxelles et collection de l'Institut royal des Sciences naturelles de Belgique (Bruxelles, Belgique)

Identifiant	Masse analysée (mg)	Teneur en os ^a	Teneur en eau ^b	Masse sèche (mg) ^c	Facteur correctif ^d
BRUCHAT-2	127,5	0,928	0,072	118,3	0,85
BRUCHAT-4	131,8	0,932	0,068	122,8	0,81
BRUCHAT-13	151,1	0,920	0,080	139,0	0,72
BRUMANAGE	124,1	0,906	0,094	112,4	0,89
BRUULB-1	113,3	0,899	0,101	101,9	0,98
BRUULB-2	148,8	0,917	0,083	136,4	0,73
BRUULB-3	126,0	0,910	0,090	114,7	0,87
BRUULB-4	116,4	0,955	0,045	111,2	0,90
BRUULB-5	136,3	0,914	0,086	124,6	0,80
BRUULB-6	141,0	0,956	0,044	134,8	0,74
BRUULB-8	129,1	0,912	0,088	117,7	0,85
BRUULB-9	137,4	0,909	0,081	124,9	0,80
BRUULB-10	148,5	0,920	0,080	136,6	0,73
BRUULB-11	129,2	0,913	0,087	118,0	0,85
BRUULB-12	143,4	0,899	0,101	128,9	0,78
BRUULB-14	127,4	0,957	0,043	121,9	0,82
BRUULB-18	129,7	0,906	0,094	117,5	0,85
BRUULB-19	136,4	0,909	0,091	124,0	0,81
BRUULB-20	122,4	0,908	0,092	111,1	0,90
BRUULB-44	136,9	0,952	0,048	130,3	0,77

Total n = 20

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Collection de Milan (Italie)

Identifiant	Masse analysée (mg)	Teneur en os ^a	Teneur en eau ^b	Masse sèche (mg) ^c	Facteur correctif ^d
MIL-19-L4R	129,2	0,919	0,081	118,7	0,84
MIL-33-L5R	109,9	0,897	0,103	98,6	1,01
MIL-39-L6R	126,6	0,904	0,096	114,4	0,87
MIL-55-L9R	122,9	0,907	0,093	111,5	0,90
MIL-62-L8R	118,8	0,914	0,086	108,6	0,92
MIL-1	111,8	0,916	0,084	102,4	0,98
MIL-9	120,6	0,918	0,082	110,7	0,90
MIL-12	117,0	0,919	0,081	107,5	0,93
MIL-15	110,6	0,910	0,090	100,6	0,99
MIL-56	118,9	0,910	0,090	108,2	0,92
MIL-41	125,4	0,915	0,085	114,7	0,87
MIL-47	121,5	0,915	0,085	111,2	0,90
MIL-70	114,4	0,903	0,097	103,3	0,97
MIL-85	118,5	0,910	0,090	107,8	0,93
MIL-94	114,9	0,906	0,094	104,1	0,96
MIL-L1F	134,5	0,889	0,111	119,6	0,84

Total n = 16

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Os d'intérêt archéologique

Identifiant	Masse analysée (mg)	Teneur en os ^a	Teneur en eau ^b	Masse sèche (mg) ^c	Facteur correctif ^d
SB3	122,4	0,941	0,059	115,2	0,87
SSPM3	115,6	0,939	0,061	108,5	0,92
LYON-03	134,7	0,954	0,046	128,5	0,78
Total n = 3					

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Collection d'os animal (*Sus scrofa*)

Identifiant	Masse analysée (mg)	Teneur en os ^a	Teneur en eau ^b	Masse sèche (mg) ^c	Facteur correctif ^d
SAterre12	114,7	0,923	0,077	105,9	0,94
SAairair12	138,4	0,927	0,073	128,3	0,78
SAairsol12	135,6	0,876	0,124	118,8	0,84
VAL12-11-22	125,2	0,885	0,115	110,8	0,90
SAterre13	132,9	0,890	0,110	118,3	0,85
SAairair13	140,4	0,886	0,114	124,4	0,80
SAairsol13	157,6	0,922	0,078	145,3	0,69
Total n = 7					

^a Rapport massique de l'échantillon après et avant lyophilisation ; ^b Différence entre 1 et la teneur en os ; ^c Produit de la masse analysée et de la teneur en os ; ^d Rapport entre 100 et la masse sèche. Appliqué aux masses analysées initiales, il permet de normaliser les spectres de tous les échantillons à 100 mg ; ^{a, b, c, d} Pour plus de détails se reporter à la partie 4, chapitre 4.2, page 142.

Annexe 7 – Valeurs des intensités spectrales normalisées mesurées en RMN du carbone-13

Collection Simon (Suisse)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution							
	≈184	182	≈173	≈170	168-168,3	157,5-157,6	128,8-130	76
	NA	Citrate	Groupe carboxyle	Groupe carboxyle	NA	Cδ Arg	Composés aromatiques Lipides	Citrate
Simon VAL-06	ND	1703190	15220941	10741897	ND	929519	1258669	861676
Simon TRE-11	ND	1722912	13967509	9765876	ND	826751	1090680	1025916
Simon AIG-10	ND	1415331	13726352	9321926	ND	913588	1138747	850387
Simon AIG-43	ND	1660848	15014064	10357999	ND	976715	1172115	826620
Simon AIG-48	ND	1670026	14331819	10213084	ND	974373	985190	759752

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution (suite)							
	70,1-70,8	58,2-59,7	53,2-54	49,2-50,3	47,1-47,6	42,7-43,3	37,6-38,8	32,3-33
	Cγ Hyp	Cα Pro Cα Hyp	Cδ Hyp Cα Glu	Cα Ala Citrate	Cδ Pro	Cα Gly	Cβ Hyp	NA
Simon VAL-06	4076300	9746409	6753482	6735707	6898625	11703032	5270106	ND
Simon TRE-11	4155130	9427407	6495755	6649466	6578138	10787831	4769024	ND
Simon AIG-10	3780696	8934034	6091798	6040008	6183517	10497738	5312512	7439947
Simon AIG-43	4223532	9889445	6645672	6718143	6816342	11656798	5202730	ND
Simon AIG-48	4106354	9573862	6454576	6382202	6632206	10814465	4941530	ND

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution (suite)						
	29,1-30,5	28,3	24,1-25,2	≈19	16,4-18,8	14,1-14,6	≈12
	Cβ Pro Cβ Arg Lipides	Cγ Arg	Cγ Pro Cβ Glu	Acides aminés minoritaires	Cβ Ala	Lipides	NA
Simon VAL-06	7385286	NI	8323949	4480670	5206136	ND	808089
Simon TRE-11	7039281	NI	7542549	4043925	4332293	ND	363549
Simon AIG-10	9479759	NI	7990994	4003981	4684383	ND	704390
Simon AIG-43	7105113	NI	8131568	4393147	5006863	ND	646974
Simon AIG-48	6876125	NI	7897216	4109667	4398283	ND	571182

NA : non attribué ; NI : non individualisable (pic présent mais superposé au massif) ; ND : non détectable

Collection de l'Inrap Grand Est nord (France)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution							
	≈184	182	≈173	≈170	168-168,3	157,5-157,6	128,8-130	76
	NA	Citrate	Groupe carboxyle	Groupe carboxyle	NA	Cδ Arg	Composés aromatiques Lipides	Citrate
Sorbey-1-1	ND	1403429	12444763	9124259	ND	899005	900591	594751
Sorbey-1-3	ND	674339	8259426	NI	ND	597276	584722	NI
Sorbey-1-4	ND	1268923	11819095	8434182	ND	742068	881035	816166
Sorbey-1-5	ND	1003734	10799825	7693352	ND	699792	833940	724119
MV-5	ND	1498010	14024875	9839302	ND	938729	1059105	958052
MV-6-1	ND	1577673	13965054	10081013	ND	806825	1115057	906034
MV-6-2	ND	1450158	14718361	10084691	ND	912486	1184621	998360
MV-6-3	ND	1440120	14337502	10242419	ND	880176	1166041	649686
MV-6-4	ND	1644402	13887446	9874584	ND	800610	1045586	757566
MV-13-1	ND	1520009	13315420	9415170	ND	822410	1870357	925442
MV-13-2	2334516	3140287	14675547	9697563	5144307	831502	2873141	756691
MV-13-3	1056671	NI	13015006	8906394	ND	734450	1942737	782190
MV-13-4	984853	2044994	13264653	9379864	ND	713141	1582179	773566
MV-13-5	ND	1226240	10818127	NI	ND	580613	765939	481928
MV-13-6	7630159	7214705	11801789	8079475	ND	629480	6316868	ND
MV-13-7	ND	ND	7091598	5283001	ND	352854	466214	ND
MV-13-8	ND	659262	7541701	NI	ND	401593	603748	ND
MV-13-9	ND	537098	6968421	NI	ND	415182	586178	ND

Collection de l'Inrap Grand Est nord (France) (suite)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution (suite)							
	70,1-70,8	58,2-59,7	53,2-54	49,2-50,3	47,1-47,6	42,7-43,3	37,6-38,8	32,3-33
	C γ Hyp	Ca Pro Ca Hyp	C δ Hyp Ca Glu	Ca Ala Citrate	C δ Pro	Ca Gly	C β Hyp	NA
Sorbey-1-1	3480845	7636589	5295449	ND	5726076	9369690	4429104	ND
Sorbey-1-3	2732395	4858516	3626117	ND	3421817	5833581	2852612	ND
Sorbey-1-4	3414504	7627926	5299005	5330621	5464513	8920289	4228333	ND
Sorbey-1-5	3450930	7192208	4806042	NI	4817385	8284849	NI	ND
MV-5	4134019	9452011	6420347	NI	6447868	10955062	4858058	ND
MV-6-1	3823815	8970606	6261568	NI	6498771	10541141	4899242	ND
MV-6-2	4321393	10012626	6704780	6605063	6630327	11407301	4882542	ND
MV-6-3	3854678	9249938	6236349	6377797	6431171	10637996	4776059	ND
MV-6-4	3960925	9070876	6199026	6354050	6363520	10754209	4758900	ND
MV-13-1	3919617	8829520	5981483	6148179	6178538	10420895	5442761	9988633
MV-13-2	4653977	9554294	6796956	6409973	6412064	11740751	9143749	32866448
MV-13-3	4019292	8761948	6024196	5923895	5739601	10223647	5671857	13127906
MV-13-4	3876710	9005658	6103161	6220986	6209389	10586443	6086540	15702875
MV-13-5	3104514	6831970	4879449	4742904	4856992	7779386	3596194	ND
MV-13-6	5914311	7848487	5300170	5286575	5318769	10825818	25254138	133232833
MV-13-7	1716020	3784212	2917204	2814916	NI	3884650	2375597	ND
MV-13-8	1503778	3589112	2864833	2867755	NI	3509818	2097153	ND
MV-13-9	1142676	3118712	2575940	2462600	2993517	2346312	NI	ND

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution (suite)						
	29,1-30,5	28,3	24,1-25,2	≈19	16,4-18,8	14,1-14,6	≈12
	C β Pro C β Arg Lipides	C γ Arg	C γ Pro C β Glu	Acides aminés minoritaires	C β Ala	Lipides	NA
Sorbey-1-1	5878748	ND	6890437	3935980	4343657	ND	706630
Sorbey-1-3	4330706	ND	4494121	2756020	NI	ND	449200
Sorbey-1-4	5543002	ND	6572623	3695668	3959729	ND	665631
Sorbey-1-5	5396459	ND	6172502	3335119	3512455	ND	488349
MV-5	6715852	ND	7628936	4015037	4589191	ND	424674
MV-6-1	6805474	ND	7675016	4309234	4431651	ND	573033
MV-6-2	7085475	ND	7801117	4011094	4483679	ND	354518
MV-6-3	6637487	ND	7613377	ND	5312710	ND	794175
MV-6-4	6601813	ND	7743478	4258869	4692544	ND	707392
MV-13-1	10260322	6604168	7798501	3909680	4413808	2026188	646235
MV-13-2	NI	11483601	10576936	3761500	5456872	5870558	NI
MV-13-3	9445137	7453896	7802562	3609428	4519531	2412241	539440
MV-13-4	9591408	7069016	8189530	3823127	4499618	2497798	616642
MV-13-5	4978949	ND	5661778	3370408	3291009	ND	474151
MV-13-6	26196515	26647299	23019028	3615857	4324165	22732241	ND
MV-13-7	2713437	NI	3158593	NI	2244232	NI	435179
MV-13-8	2684309	NI	2967641	NI	2425181	ND	D
MV-13-9	2656804	NI	2159408	NI	2195376	ND	ND

NA : non attribué ; NI : non individualisable (pic présent mais superposé au massif) ; ND : non détectable

Collection de Prague (République tchèque)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution							
	≈184	182	≈173	≈170	168-168,3	157,5-157,6	128,8-130	76
	NA	Citrate	Groupe carboxyle	Groupe carboxyle	NA	C δ Arg	Composés aromatiques Lipides	Citrate
PRG/91	1900275	2756021	12695967	NI	ND	778928	8893626	851374
PRG242/93	ND	2017233	14768897	10112716	ND	892301	1204785	1181721
PRG343/94	ND	1676603	15682804	10593858	ND	1091647	1252143	746727
PRG342/94	ND	1920979	14549819	9989959	ND	830271	1171350	888845
PRG596/95	ND	1817583	14373658	10022211	ND	722013	1080858	1219200
PRG709/2001	ND	1526811	13363541	9308415	ND	835580	1029314	884710
PRG717/2003	ND	1690648	14110268	9756958	ND	846061	1052340	980569
PRG1116/2004	ND	1577406	14459270	10105451	ND	939261	1206004	1004666
PRG827/2004	ND	1579686	14469213	9831238	ND	860537	1130017	1010672
PRG518/2005	ND	1946465	13105907	NI	ND	805982	1128209	782989
PRG567/2010	ND	1751140	13813624	9502338	ND	773574	1100200	967885
PRG1021/2010	ND	1828822	13994614	9537723	ND	1065496	962159	1028597

Collection de Prague (République tchèque) (suite)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution (suite)							
	70,1-70,8	58,2-59,7	53,2-54	49,2-50,3	47,1-47,6	42,7-43,3	37,6-38,8	32,3-33
	C γ Hyp	Ca Pro Ca Hyp	C δ Hyp Ca Glu	Ca Ala Citrate	C δ Pro	Ca Gly	C β Hyp	NA
PRG/91	3670247	8541337	5652814	5930676	5911388	10086995	6867128	24174382
PRG242/93	4417168	9788500	6649121	7045431	7083943	11624984	5474391	ND
PRG343/94	4559506	10286017	7100316	7113041	7165595	12392223	5793578	ND
PRG342/94	4043588	9489003	6525027	NI	6745838	11316732	5552771	ND
PRG596/95	4187021	9838787	6454824	6848674	6814429	11468759	6078729	ND
PRG709/2001	3628846	8506200	5814674	6047884	NI	10044348	5100433	ND
PRG717/2003	4026892	9187251	6346051	6389286	6512903	10896511	4917610	ND
PRG1116/2004	4225257	9823071	6646082	6832973	6799994	11453361	5038737	ND
PRG827/2004	3985534	9349921	6263959	6486031	6584428	11152594	5480291	ND
PRG518/2005	3666426	8457925	5859701	6306038	6234101	9917891	5183168	ND
PRG567/2010	4218926	9031150	6149555	6464261	6438009	10712199	4768163	ND
PRG1021/2010	4177374	9468569	6434818	6553413	6601808	10904295	4701283	ND

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution (suite)						
	29,1-30,5	28,3	24,1-25,2	≈ 19	16,4-18,8	14,1-14,6	≈ 12
	C β Pro C β Arg Lipides	C γ Arg	C γ Pro C β Glu	Acides aminés minoritaires	C β Ala	Lipides	NA
PRG/91	35037411	16071247	9721674	3915575	4216338	4742839	NI
PRG242/93	9587654	NI	8901774	4198608	4880662	ND	692437
PRG343/94	10384084	NI	9511089	4204199	5538964	ND	863118
PRG342/94	10303320	NI	8908411	4208134	4860581	ND	747582
PRG596/95	11621708	NI	9960832	3959308	4569302	2366154	687182
PRG709/2001	10640762	NI	8388726	3851229	4479335	ND	729369
PRG717/2003	7706313	NI	8035162	4086389	4793864	ND	667907
PRG1116/2004	7841229	NI	8170821	4076886	4752680	ND	395875
PRG827/2004	9568593	NI	9029357	4017322	5035402	1865892	827940
PRG518/2005	10117159	NI	8494727	4241274	4335461	1713400	638733
PRG567/2010	7275957	NI	7792672	3891131	4474225	ND	448675
PRG1021/2010	6959735	NI	7815608	3853313	4572400	ND	415483

NA : non attribué ; NI : non individualisable (pic présent mais superposé au massif) ; ND : non détectable

Collection de l'IRCGN (France)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution							
	≈184	182	≈173	≈170	168-168,3	157,5-157,6	128,8-130	76
	NA	Citrate	Groupe carboxyle	Groupe carboxyle	NA	Cδ Arg	Composés aromatiques Lipides	Citrate
IRCGN-01	ND	1866871	14262421	NI	ND	764204	1117459	1017306
IRCGN-02	ND	1680675	14985898	9708422	ND	779077	1064741	1433948
IRCGN-03	ND	1546287	13228101	9320995	ND	883894	914568	1023787
IRCGN-06	ND	1338947	13250661	9114953	ND	707844	971419	695892
IRCGN-07	ND	NI	8836358	6190193	ND	485682	645907	ND
IRCGN-08	ND	1476399	13813712	9123261	ND	821665	1145936	747362
IRCGN-12	ND	NI	3433567	2431328	ND	ND	485943	ND
IRCGN-14	ND	ND	1669180	1373556	ND	ND	ND	ND
IRCGN-15	ND	1213835	10025458	NI	ND	504797	858597	930060
IRCGN-16	ND	NI	13609182	9650719	ND	925238	1052109	1049493
IRCGN-17	ND	1578355	12835796	8783386	ND	753758	1011627	900837
IRCGN-18	ND	1467102	12287832	NI	ND	768809	873492	761214
IRCGN-19	729963	ND	13711086	9605292	ND	975951	1433687	904472
IRCGN-20	ND	NI	10307804	NI	ND	727371	785000	444483
IRCGN-22	ND	NI	13054668	9024506	ND	771859	1015837	770346
IRCGN-24	ND	1381101	13218251	9418227	ND	735845	1113404	758328
IRCGN-25	ND	969634	11086590	8144743	ND	696400	919884	758353
IRCGN-26	ND	1692691	13876571	9634529	ND	938210	1155684	723068
IRCGN-27	ND	1642650	13248538	9065018	ND	760336	857082	856497
IRCGN-28	ND	1469268	13224171	9352156	ND	789810	996678	818116
IRCGN-29	ND	1671675	14225737	NI	ND	909534	1107467	706847
IRCGN-30	ND	1449146	12729748	9043358	ND	812614	1099064	746748
IRCGN-31	ND	1809125	12787602	NI	ND	849255	1065857	966311
IRCGN-32	ND	1030131	8174528	5732306	ND	425512	694475	ND
IRCGN-33	ND	1651164	13295103	9261011	ND	796110	1006556	865969
IRCGN-35	ND	1276559	12858083	8953354	ND	836118	956643	674285
IRCGN-36	ND	1465980	13791792	9732888	ND	792073	1300472	875477
IRCGN-37	ND	660038	7325242	5372231	ND	375983	633585	ND
IRCGN-38	ND	1837475	14220165	10091033	ND	862211	963586	877185
#3/2002	1942898	2702252	15688849	10452207	5684991	896279	3125880	825764
#4/2002	988183	NI	15049323	10243343	ND	924229	2525214	629876
#6/2003	ND	1570802	13730362	9331287	ND	761266	1566447	855915
#2/2003	1641904	2499527	14048701	9734427	ND	681262	4920396	700420
#9/2002	962171	1864118	14275996	9474989	NI	897932	1869285	1045119

Collection de l'IRCGN (France) (suite)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution (suite)							
	70,1-70,8	58,2-59,7	53,2-54	49,2-50,3	47,1-47,6	42,7-43,3	37,6-38,8	32,3-33
	C γ Hyp	C α Pro C α Hyp	C δ Hyp C α Glu	C α Ala Citrate	C δ Pro	C α Gly	C β Hyp	NA
IRCGN-01	4103149	9380580	6613636	6773810	6812457	10959666	5121549	ND
IRCGN-02	4679822	9832243	6944746	6609637	6673253	11377499	5029911	ND
IRCGN-03	4099264	8830248	6050570	6092348	6040666	10234706	4759916	ND
IRCGN-06	3924248	8855725	6136832	5878163	5854122	10321442	4692083	ND
IRCGN-07	2529908	5462363	3947619	NI	3831907	6693149	3169043	ND
IRCGN-08	3972229	8825757	5991791	6057486	NI	10261945	4759566	ND
IRCGN-12	990673	2092387	1482448	NI	NI	2362919	1179643	ND
IRCGN-14	356300	910877	765175	NI	NI	888548	NI	ND
IRCGN-15	3056534	6801328	4654683	4621246	4638667	7782383	3346814	ND
IRCGN-16	3912651	8924872	6082684	6273753	6275106	10478662	4763166	ND
IRCGN-17	3799130	8305060	5632394	NI	5815669	9865177	4248807	ND
IRCGN-18	3477318	8046362	5651028	NI	5677078	9298837	4232460	ND
IRCGN-19	4079458	9226119	6372635	6365023	6284570	10738727	5455384	9153958
IRCGN-20	2754235	6246158	4522041	NI	4618744	7420087	3615625	ND
IRCGN-22	3880435	8644079	5873196	5759561	5708100	9962003	4528485	ND
IRCGN-24	3858676	8713379	6164020	5965268	5973911	10288688	4414003	ND
IRCGN-25	3472593	7232634	5021880	5047919	NI	8446098	3926900	ND
IRCGN-26	4010627	9309383	6285874	6313434	6297677	10827570	4728599	ND
IRCGN-27	3821290	8762326	6032977	6007290	6059626	10234139	4565606	ND
IRCGN-28	3877395	8771063	5903703	NI	6071048	10358016	4466649	ND
IRCGN-29	3827170	9055870	6526674	NI	6345817	10563374	4868486	ND
IRCGN-30	3826153	8546364	5962489	5915736	5862495	9922249	4516049	ND
IRCGN-31	3957394	8455138	5904057	NI	6135014	9649376	4504903	ND
IRCGN-32	2295695	5259696	3819620	3554190	NI	5942603	2827358	ND
IRCGN-33	3578593	8484096	6044042	6032491	NI	9614323	4843264	ND
IRCGN-35	3788189	8298500	5621956	5649112	5845578	9806631	4420776	ND
IRCGN-36	4193908	9346456	6376500	6431325	6420799	10934279	5326270	7305859
IRCGN-37	1969623	4592218	3236561	NI	3114953	5646434	2626939	ND
IRCGN-38	3683420	9013029	6372591	6325251	6264151	10409470	5183573	ND
#3/2002	4823453	10236220	7106385	6713390	6771455	12403884	8489744	27398916
#4/2002	4446964	9561376	6743926	6517930	NI	11625372	7071354	14639216
#6/2003	4050060	9102742	6281620	6119054	NI	10794577	5057570	ND
#2/2003	4086660	9359671	6148075	6490743	6288534	11066657	6609709	17067221
#9/2002	4076570	9360334	6330218	6403691	6576071	11167790	5859022	9342335

Collection de l'IRCGN (France) (suite)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution (suite)						
	29,1-30,5	28,3	24,1-25,2	≈19	16,4-18,8	14,1-14,6	≈12
	Cβ Pro Cβ Arg Lipides	Cγ Arg	Cγ Pro Cβ Glu	Acides aminés minoritaires	Cβ Ala	Lipides	NA
IRCGN-01	7077404	NI	8039508	4306270	4582811	ND	571521
IRCGN-02	7188893	NI	8314779	3668871	4875701	ND	295622
IRCGN-03	6476296	NI	7441513	NI	4373886	ND	567497
IRCGN-06	6644308	NI	7490160	3884353	4551621	ND	506970
IRCGN-07	4207325	NI	5016238	2827404	3103377	ND	608878
IRCGN-08	6608181	NI	7504838	3785851	4703978	ND	566892
IRCGN-12	1499796	NI	1695529	NI	1137599	ND	ND
IRCGN-14	680881	NI	819853	559927	517234	ND	181476
IRCGN-15	5038957	NI	5671259	3232999	3090534	ND	441496
IRCGN-16	6650306	NI	7610240	4058939	4480354	ND	607935
IRCGN-17	6300291	NI	7126105	3702511	4238838	ND	542935
IRCGN-18	5893908	ND	7000205	3939483	3951556	ND	414315
IRCGN-19	8743504	6287298	7980122	NI	4573134	1572787	NI
IRCGN-20	4860587	NI	5950989	3499359	3378835	ND	NI
IRCGN-22	7432789	NI	7213465	3814943	4270585	ND	535180
IRCGN-24	6339513	NI	7380775	3913911	4443671	ND	547024
IRCGN-25	5551711	NI	6299676	3450062	3641434	ND	440873
IRCGN-26	6732090	NI	7725140	4006210	4485217	ND	666704
IRCGN-27	6479059	NI	7312067	3877293	4383092	ND	572471
IRCGN-28	6462324	NI	7218757	3919681	4357146	ND	487793
IRCGN-29	6864998	NI	7993997	4362079	4405911	ND	473954
IRCGN-30	6495377	NI	7153246	3831057	4239067	ND	528180
IRCGN-31	6212867	NI	7128892	3864083	3929420	ND	343988
IRCGN-32	3989757	NI	4410727	2693350	2786915	ND	433155
IRCGN-33	6501815	NI	7403121	3962751	4626464	ND	ND
IRCGN-35	6135726	NI	7213860	3917530	4264857	ND	722836
IRCGN-36	8599508	NI	8093545	4081688	4494395	NI	488071
IRCGN-37	3312622	NI	4085032	2243834	2474042	ND	546791
IRCGN-38	7634314	NI	7719952	4263354	4853964	ND	655485
#3/2002	14931811	11574295	10756391	3801068	5762146	4995003	532184
#4/2002	16691019	9233511	10151171	4482291	5222033	3517582	810359
#6/2003	9652695	6303515	8014247	4116297	4927756	ND	537187
#2/2003	16512047	11197571	8598339	4458582	4660950	3736350	470128
#9/2002	12263164	7522709	8939632	4150349	4825299	2486098	691750

NA : non attribué ; NI : non individualisable (pic présent mais superposé au massif) ; ND : non détectable

Collection de l'École de Chirurgie (France)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution							
	≈184	182	≈173	≈170	168-168,3	157,5-157,6	128,8-130	76
	NA	Citrate	Groupe carboxyle	Groupe carboxyle	NA	Cδ Arg	Composés aromatiques Lipides	Citrate
EC12-2502	ND	1656828	13651972	9550529	ND	782793	1077345	955817
EC12-2693	ND	1355425	13553213	9688718	ND	832964	1171306	998336
EC12-2673	ND	1617903	13265181	8973608	ND	867846	1087179	777397
EC12-2652	ND	NI	13576442	9231965	ND	809466	1120420	1017428

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution (suite)							
	70,1-70,8	58,2-59,7	53,2-54	49,2-50,3	47,1-47,6	42,7-43,3	37,6-38,8	32,3-33
	Cγ Hyp	Ca Pro Ca Hyp	Cδ Hyp Ca Glu	Ca Ala Citrate	Cδ Pro	Ca Gly	Cβ Hyp	NA
EC12-2502	3934266	8898453	6417031	NI	6512075	10576880	4842460	ND
EC12-2693	3851399	8884511	6203686	NI	6440661	10376958	4688254	ND
EC12-2673	3865710	8693750	6086624	5995210	5906242	10237896	4561582	ND
EC12-2652	3783788	8853515	6097800	NI	6232019	10287459	4662533	ND

Collection de l'École de Chirurgie (France) (suite)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution (suite)						
	29,1-30,5	28,3	24,1-25,2	≈19	16,4-18,8	14,1-14,6	≈12
	Cβ Pro Cβ Arg Lipides	Cγ Arg	Cγ Pro Cβ Glu	Acides aminés minoritaires	Cβ Ala	Lipides	NA
EC12-2502	7469937	NI	7804338	3732247	4481148	ND	530260
EC12-2693	8339946	NI	7806525	3952303	4185561	ND	445313
EC12-2673	6851195	NI	7464488	3752437	4699097	ND	746819
EC12-2652	8099841	NI	7709510	3904683	4219458	ND	440629

NA : non attribué ; NI : non individualisable (pic présent mais superposé au massif) ; ND : non détectable

Collections de Bruxelles (Belgique)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution							
	≈184	182	≈173	≈170	168-168,3	157,5-157,6	128,8-130	76
	NA	Citrate	Groupe carboxyle	Groupe carboxyle	NA	Cδ Arg	Composés aromatiques Lipides	Citrate
BRUCHAT-2	ND	1205986	12593794	9787840	ND	905989	1022979	ND
BRUCHAT-4	5187781	5114325	14105219	NI	ND	912045	6662251	321528
BRUCHAT-13	1305145	1932446	13137518	9429387	ND	705985	1647343	ND
BRUMANAGE	ND	1724956	13384537	NI	ND	904617	1124794	1040390
BRUULB-1	ND	1906799	17134871	11598271	ND	795631	1521544	1140456
BRUULB-2	ND	1490564	14016890	9503410	ND	726014	1258738	901825
BRUULB-3	ND	1482652	13330790	9193440	ND	751155	1181862	914060
BRUULB-4	ND	1507159	13402186	9829460	ND	908910	1003402	771954
BRUULB-5	ND	1628762	13245527	9130749	ND	803421	1208203	908978
BRUULB-6	ND	1588017	12710084	8700584	ND	719642	1061401	942783
BRUULB-8	ND	1471764	14143926	9593368	ND	762560	1222330	760966
BRUULB-9	ND	1592311	13556402	9241679	ND	717496	1109730	893651
BRUULB-10	ND	1468463	13259043	9068812	ND	736157	1077408	832121
BRUULB-11	ND	1597759	12970059	8830332	ND	688371	927027	833243
BRUULB-12	ND	1624022	15356766	10532004	ND	826094	1656088	877474
BRUULB-14	ND	1358336	13294648	9502302	ND	846321	1081836	800778
BRUULB-18	ND	1747024	14404027	9685163	ND	767509	1109269	746681
BRUULB-19	ND	1454023	13719437	9607795	ND	721911	1163815	819995
BRUULB-20	ND	1786090	14484707	9993318	ND	685035	1211337	1182567
BRUULB-44	ND	1573367	13714964	9579678	ND	786606	1240497	790448

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution (suite)							
	70,1-70,8	58,2-59,7	53,2-54	49,2-50,3	47,1-47,6	42,7-43,3	37,6-38,8	32,3-33
	Cγ Hyp	Ca Pro Ca Hyp	Cδ Hyp Ca Glu	Ca Ala Citrate	Cδ Pro	Ca Gly	Cβ Hyp	NA
BRUCHAT-2	3521556	8408770	5730149	5499753	NI	9727819	4439869	ND
BRUCHAT-4	3851299	9194299	6288065	6447248	NI	11174611	13459612	95816452
BRUCHAT-13	3660666	8929782	5811719	5621988	NI	10340833	6077930	21049062
BRUMANAGE	3918605	8778625	6187125	NI	6279699	10042089	4735903	ND
BRUULB-1	5421281	11406842	7886687	7564313	7610859	12965307	5520218	ND
BRUULB-2	4105956	9278085	6393864	6339884	6343739	10779772	4734257	ND
BRUULB-3	3961873	9111692	6114962	6140902	6122263	10469355	4580031	ND
BRUULB-4	3833971	8881376	6027672	NI	6240982	10452546	4698543	ND
BRUULB-5	3544180	8562627	6265322	6092194	NI	9292875	4811850	ND
BRUULB-6	3919041	8592074	5827904	5846272	5835538	10031476	4341272	ND
BRUULB-8	4035011	9552386	6693194	6574655	6535847	10922451	4550185	ND
BRUULB-9	3707733	8879955	6132959	NI	6181861	10180559	4675036	ND
BRUULB-10	3842388	8815900	6065427	5889594	6057014	10401744	4575368	ND
BRUULB-11	3557400	8527648	5996021	5889737	NI	8774355	4383651	ND
BRUULB-12	4286758	10022599	7181355	6803117	6949272	11630018	5707830	ND
BRUULB-14	3949614	8994896	6123312	6166849	6248597	10269090	4558407	ND
BRUULB-18	4076865	9256530	6415768	6309140	6360063	11202701	4992892	ND
BRUULB-19	3936601	9103991	6361060	NI	6355239	10688813	4810336	ND
BRUULB-20	4044160	9831946	6892648	6747308	NI	11161972	4871600	ND
BRUULB-44	3994302	9134622	6269647	6162759	6156187	10704608	4697807	ND

Collections de Bruxelles (Belgique) (suite)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution (suite)						
	29,1-30,5	28,3	24,1-25,2	≈19	16,4-18,8	14,1-14,6	≈12
	Cβ Pro Cβ Arg Lipides	Cγ Arg	Cγ Pro Cβ Glu	Acides aminés minoritaires	Cβ Ala	Lipides	NA
BRUCHAT-2	6141312	NI	6964003	3980167	3965091	ND	489376
BRUCHAT-4	NI	14869110	16060346	4628692	4508502	12434486	ND
BRUCHAT-13	NI	6814028	8321959	3891547	4430939	2850063	ND
BRUMANAGE	6366484	NI	7517365	4056805	4277088	ND	599161
BRUULB-1	9096489	NI	9528618	5876568	4641950	ND	ND
BRUULB-2	7762090	NI	8182345	4157695	4777266	ND	815481
BRUULB-3	7157483	NI	7368845	3849016	4612389	ND	616089
BRUULB-4	6983708	NI	7440177	4033594	4102749	ND	543341
BRUULB-5	8297694	NI	7190963	3564891	4422124	ND	612720
BRUULB-6	7576786	NI	7083913	3511361	4201504	ND	436629
BRUULB-8	7135909	NI	7511224	3719341	4789851	ND	463968
BRUULB-9	7213559	NI	7510102	3846930	4612866	ND	518794
BRUULB-10	7583363	NI	7599724	3788836	4605905	ND	559731
BRUULB-11	6489912	NI	6894966	3848294	4604205	ND	689186
BRUULB-12	9604660	NI	8902338	4120744	5824405	ND	909016
BRUULB-14	7239130	NI	7714443	3902877	4348332	ND	ND
BRUULB-18	8108921	NI	8250086	3883734	5281142	ND	806385
BRUULB-19	7350687	NI	7759050	3941445	4779528	ND	602278
BRUULB-20	7598776	NI	7991468	3975312	4823209	ND	350913
BRUULB-44	8108842	NI	7891981	3944117	4630298	ND	625219

NA : non attribué ; NI : non individualisable (pic présent mais superposé au massif) ; ND : non détectable

Collection de Milan (Italie)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution							
	≈184	182	≈173	≈170	168-168,3	157,5-157,6	128,8-130	76
	NA	Citrate	Groupe carboxyle	Groupe carboxyle	NA	Cδ Arg	Composés aromatiques Lipides	Citrate
MIL-19-L4R	ND	1158116	11679994	8600476	ND	761821	889587	673058
MIL-33-L5R	ND	1368183	13293680	9116597	ND	453363	989156	768639
MIL-39-L6R	ND	1335710	13332635	9371775	ND	706313	1097232	846032
MIL-55-L9R	ND	1322541	12428859	8487982	ND	671582	872321	528754
MIL-62-L8R	ND	1220135	13765354	9417062	ND	838456	1056457	774890
MIL-1	ND	1452561	14561904	10131773	ND	666516	1024097	1035425
MIL-9	ND	1458624	14400892	10192174	ND	792769	1233265	709072
MIL-12	ND	1711822	15430459	10964855	ND	1031148	1262974	751079
MIL-15	ND	1895159	15039332	9956673	ND	798853	1347310	1048795
MIL-56	ND	1314259	13994000	9578648	ND	907389	1095245	795384
MIL-41	ND	1254636	14445915	9715951	ND	828366	1197070	623589
MIL-47	ND	1456458	14339563	9553198	ND	788102	982459	618199
MIL-70	ND	1280733	14915571	10102310	ND	779099	1209356	814140
MIL-85	ND	1599198	13777449	9472389	ND	795506	836695	869856
MIL-94	ND	1582727	14509469	9933262	ND	919616	1175142	771646
MIL-L1F	ND	1747891	14516913	NI	ND	908006	1016518	937977

Collection de Milan (Italie) (suite)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution (suite)							
	70,1-70,8	58,2-59,7	53,2-54	49,2-50,3	47,1-47,6	42,7-43,3	37,6-38,8	32,3-33
	C γ Hyp	Ca Pro Ca Hyp	C δ Hyp Ca Glu	Ca Ala Citrate	C δ Pro	Ca Gly	C β Hyp	NA
MIL-19-L4R	3132364	7632250	5303432	NI	5398403	8800517	4221709	ND
MIL-33-L5R	3761780	8857634	6160711	5786859	5986567	10303816	4548083	ND
MIL-39-L6R	3653492	8544390	6014518	6078112	6032801	9810641	4654894	ND
MIL-55-L9R	3146014	7654126	5608073	5309706	NI	7771577	NI	ND
MIL-62-L8R	3982625	9099969	6192627	6276089	NI	10472963	4574462	ND
MIL-1	4122876	9543317	6430616	6390220	6513596	10858733	4994503	ND
MIL-9	3944417	9200088	6402754	6184509	NI	10635656	4938375	ND
MIL-12	4216898	9793982	6939723	6864807	NI	10878650	NI	ND
MIL-15	4458373	9775013	6839421	6477077	6308935	10891537	5029648	ND
MIL-56	4136331	9237389	6345459	6221226	6136101	10316483	4627948	ND
MIL-41	3878488	9001774	6025253	6107450	5942400	10032337	4679574	ND
MIL-47	3928212	8840433	6336460	6176301	NI	9907595	4508473	ND
MIL-70	4265552	9389233	6738004	6507402	6502396	10880558	4885754	ND
MIL-85	3959836	8906709	6204715	6197246	6123776	10209235	4641507	ND
MIL-94	4042292	8991044	6312941	6174716	NI	10032288	4819435	ND
MIL-L1F	3884089	9281905	6656489	NI	6790176	10887762	5369568	ND

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution (suite)						
	29,1-30,5	28,3	24,1-25,2	≈19	16,4-18,8	14,1-14,6	≈12
	C β Pro C β Arg Lipides	C γ Arg	C γ Pro C β Glu	Acides aminés minoritaires	C β Ala	Lipides	NA
MIL-19-L4R	5638369	NI	6293018	3681348	3925599	ND	535378
MIL-33-L5R	6453002	NI	7358349	3509724	4836056	ND	280575
MIL-39-L6R	6285505	NI	7041249	3824093	4404952	ND	493369
MIL-55-L9R	5714326	NI	6377514	3777177	4294247	ND	603842
MIL-62-L8R	6280008	NI	7199972	3837531	4798682	ND	620642
MIL-1	6822509	NI	8003760	4284167	4922109	ND	741311
MIL-9	6890012	NI	7775194	4286497	5120872	ND	517815
MIL-12	7265019	NI	8073836	4710614	4910390	ND	604994
MIL-15	6975851	NI	7861333	4076202	5271028	ND	664994
MIL-56	6574525	NI	7611681	3953573	5065582	ND	431587
MIL-41	7255002	NI	7463434	3957852	4987425	ND	647972
MIL-47	6215627	NI	7432396	4091947	4660374	ND	591385
MIL-70	6757640	5894149	8171442	3981863	5542795	ND	981583
MIL-85	6495690	NI	7679394	4081191	5107480	ND	649474
MIL-94	6624219	NI	7613959	4251346	4786436	ND	805346
MIL-L1F	8401673	NI	8209315	NI	4830402	ND	701778

NA : non attribué ; NI : non individualisable (pic présent mais superposé au massif) ; ND : non détectable

Échantillons archéologiques

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution							
	≈184	182	≈173	≈170	168-168,3	157,5-157,6	128,8-130	76
	NA	Citrate	Groupe carboxyle	Groupe carboxyle	NA	C δ Arg	Composés aromatiques Lipides	Citrate
Lyon-03	ND	334685	2539277	1741681	ND	ND	ND	ND
SB3	ND	1039569	11414515	NI	ND	829598	954261	ND
SSPM3	ND	863416	10037698	NI	ND	537398	820044	ND

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution (suite)							
	70,1-70,8	58,2-59,7	53,2-54	49,2-50,3	47,1-47,6	42,7-43,3	37,6-38,8	32,3-33
	C γ Hyp	Ca Pro Ca Hyp	C δ Hyp Ca Glu	Ca Ala Citrate	C δ Pro	Ca Gly	C β Hyp	NA
Lyon-03	558003	1436018	985943	1040502	NI	1605184	771062	ND
SB3	3400294	7518443	5216098	5065626	NI	8644761	NI	ND
SSPM3	2820072	6614259	4438512	4182805	NI	7689705	3456783	ND

Échantillons archéologiques (suite)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution (suite)						
	29,1-30,5	28,3	24,1-25,2	≈19	16,4-18,8	14,1-14,6	≈12
	Cβ Pro Cβ Arg Lipides	Cγ Arg	Cγ Pro Cβ Glu	Acides aminés minoritaires	Cβ Ala	Lipides	NA
Lyon-03	1048623	NI	1143084	778648	900252	ND	179865
SB3	5493300	NI	6135114	3440962	3885007	ND	348896
SSPM3	4809127	NI	5447819	2925587	3356598	ND	ND

NA : non attribué ; NI : non individualisable (pic présent mais superposé au massif) ; ND : non détectable

Échantillons expérimentaux

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution							
	≈184	182	≈173	≈170	168-168,3	157,5-157,6	128,8-130	76
	NA	Citrate	Groupe carboxyle	Groupe carboxyle	NA	Cδ Arg	Composés aromatiques Lipides	Citrate
SAterre12	ND	1326285	11897783	7871060	ND	552545	1073354	800019
SAairair12	ND	NI	15186111	10604325	ND	1042181	2025877	1124445
SAairsol12	ND	1495579	11288425	7772456	ND	736186	1543545	874606
VAL12-11-22	ND	1291271	12389903	8301172	4523113	692159	1221701	751301
SAterre13	ND	933737	10520264	7077599	ND	772694	853591	657409
SAairair13	ND	1918192	14615099	9901652	ND	886614	1645265	1126082
SAairsol13	817638	NI	12973309	8871996	ND	793022	2026200	830482

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution (suite)							
	70,1-70,8	58,2-59,7	53,2-54	49,2-50,3	47,1-47,6	42,7-43,3	37,6-38,8	32,3-33
	Cγ Hyp	Ca Pro Ca Hyp	Cδ Hyp Ca Glu	Ca Ala Citrate	Cδ Pro	Ca Gly	Cβ Hyp	NA
SAterre12	3681629	8158813	5621590	5264407	5223406	9063714	4260970	ND
SAairair12	4677634	10293589	6973772	NI	7130967	11872035	6080043	11464908
SAairsol12	3265028	7307049	5269488	NI	5142910	8436653	4489676	6200061
VAL12-11-22	3947128	7975453	5953997	5363685	5042250	8756227	NI	ND
SAterre13	3066348	6646786	4906616	4467024	4381160	7344286	3779214	1805941
SAairair13	4465299	9584443	6696061	6554084	NI	10477820	5858075	9914235
SAairsol13	3681331	8356496	5843272	5736788	5535287	9412762	5375615	10518889

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution (suite)						
	29,1-30,5	28,3	24,1-25,2	≈19	16,4-18,8	14,1-14,6	≈12
	Cβ Pro Cβ Arg Lipides	Cγ Arg	Cγ Pro Cβ Glu	Acides aminés minoritaires	Cβ Ala	Lipides	NA
SAterre12	6496762	NI	6657096	2928397	4159591	ND	504161
SAairair12	14317626	7753291	9328319	4405145	4808983	2224121	ND
SAairsol12	10408256	5505728	6816526	3299374	3550474	1369475	713841
VAL12-11-22	6439019	5387344	7233284	3292252	4790724	ND	595115
SAterre13	5192445	NI	6065897	2718572	4042688	ND	602194
SAairair13	12219699	7207925	8652555	3993984	4882608	1953877	758737
SAairsol13	10805069	7327420	7791183	3653758	4578299	2252101	801712

NA : non attribué ; NI : non individualisable (pic présent mais superposé au massif) ; ND : non détectable

Annexe 8 – Valeurs des aires spectrales normalisées mesurées en RMN du carbone-13 pour toutes les collections

Identifiant	Groupes Carboxyle	Chaînes aliphatiques	Ratio ALICO
Collection Simon			
Simon VAL-06	0,71	1,83	2,56
Simon TRE-11	0,68	1,77	2,63
Simon AIG-10	0,65	1,83	2,83
Simon AIG-43	0,71	1,82	2,57
Simon AIG-48	0,68	1,74	2,57
Collections de l'Inrap Grand Est nord			
Sorbey-1-1	0,60	1,54	2,56
Sorbey-1-3	0,40	1,08	2,71
Sorbey-1-4	0,56	1,48	2,63
Sorbey-1-5	0,51	1,38	2,69
MV-5	0,66	1,73	2,62
MV-6-1	0,68	1,77	2,62
MV-6-2	0,68	1,81	2,65
MV-6-3	0,69	1,74	2,53
MV-6-4	0,67	1,71	2,58
MV-13-1	0,64	1,90	2,97
MV-13-2	0,68	2,55	3,76
MV-13-3	0,61	1,88	3,08
MV-13-4	0,64	1,98	3,12
MV-13-5	0,52	1,33	2,54
MV-13-6	0,69	5,03	7,30
MV-13-7	0,34	0,82	2,45
MV-13-8	0,35	0,81	2,30
MV-13-9	0,34	0,73	2,15
Collection de Prague			
PRG/91	0,66	2,51	3,80
PRG242/93	0,72	1,94	2,71
PRG343/94	0,72	1,98	2,73
PRG342/94	0,70	1,94	2,76
PRG596/95	0,71	2,10	2,95
PRG709/2001	0,64	1,79	2,78
PRG717/2003	0,66	1,73	2,62
PRG1116/2004	0,69	1,83	2,66
PRG827/2004	0,68	1,86	2,73
PRG518/2005	0,67	1,84	2,73
PRG567/2010	0,66	1,71	2,61
PRG1021/2010	0,66	1,72	2,60
Collections de l'IRCGN			
IRCGN-01	0,70	1,87	2,66
IRCGN-02	0,68	1,81	2,67
IRCGN-03	0,63	1,67	2,67
IRCGN-06	0,61	1,67	2,73
IRCGN-07	0,42	1,08	2,57
IRCGN-08	0,64	1,68	2,62
IRCGN-12	0,18	0,38	2,15
IRCGN-14	0,09	0,17	1,97
IRCGN-15	0,49	1,32	2,67
IRCGN-16	0,66	1,72	2,59
IRCGN-17	0,60	1,57	2,61
IRCGN-18	0,60	1,58	2,63
IRCGN-19	0,66	1,88	2,86
IRCGN-20	0,50	1,31	2,61
IRCGN-22	0,63	1,65	2,63
IRCGN-24	0,62	1,61	2,59
IRCGN-25	0,54	1,42	2,63
IRCGN-26	0,65	1,70	2,59
IRCGN-27	0,63	1,64	2,62
IRCGN-28	0,63	1,64	2,60
IRCGN-29	0,69	1,80	2,63
IRCGN-30	0,61	1,63	2,67
IRCGN-31	0,63	1,65	2,65
IRCGN-32	0,40	1,04	2,57
IRCGN-33	0,64	1,68	2,62

Identifiant	Groupes Carboxyle	Chaînes aliphatiques	Ratio ALICO
IRCGN-35	0,61	1,56	2,57
IRCGN-36	0,66	1,87	2,82
IRCGN-37	0,36	0,88	2,47
IRCGN-38	0,68	1,81	2,65
#3/2002	0,71	2,49	3,52
#4/2002	0,72	2,32	3,24
#6/2003	0,66	1,77	2,70
#2/2003	0,69	2,18	3,17
#9/2002	0,68	2,02	2,97
Collection de l'École de Chirurgie			
EC12-2502	0,67	1,77	2,65
EC12-2693	0,67	1,77	2,64
EC12-2673	0,63	1,62	2,59
EC12-2652	0,66	1,74	2,66
Collections de Bruxelles			
BRUCHAT-2	0,61	1,61	2,62
BRUCHAT-4	0,75	3,77	5,01
BRUCHAT-13	0,65	1,99	3,06
BRUMANAGE	0,65	1,70	2,61
BRULB-1	0,78	2,08	2,66
BRULB-2	0,65	1,74	2,66
BRULB-3	0,63	1,64	2,61
BRULB-4	0,65	1,66	2,55
BRULB-5	0,63	1,70	2,68
BRULB-6	0,60	1,59	2,64
BRULB-8	0,66	1,73	2,63
BRULB-9	0,64	1,69	2,63
BRULB-10	0,62	1,65	2,64
BRULB-11	0,63	1,64	2,62
BRULB-12	0,72	1,97	2,74
BRULB-14	0,63	1,68	2,66
BRULB-18	0,66	1,71	2,59
BRULB-19	0,66	1,75	2,63
BRULB-20	0,70	1,84	2,64
BRULB-44	0,65	1,70	2,63
Collection de Milan			
MIL-19-L4R	0,56	1,49	2,66
MIL-33-L5R	0,61	1,61	2,66
MIL-39-L6R	0,64	1,66	2,60
MIL-55-L9R	0,58	1,51	2,58
MIL-62-L8R	0,63	1,63	2,58
MIL-1	0,67	1,77	2,62
MIL-9	0,68	1,76	2,61
MIL-12	0,73	1,89	2,58
MIL-15	0,68	1,77	2,59
MIL-56	0,64	1,68	2,64
MIL-41	0,65	1,67	2,57
MIL-47	0,66	1,67	2,54
MIL-70	0,67	1,71	2,57
MIL-85	0,65	1,65	2,55
MIL-94	0,66	1,68	2,55
MIL-L1F	0,71	1,92	2,69
Échantillons archéologiques			
SB3	0,54	1,44	2,68
SSPM3	0,46	1,22	2,65
Lyon-03	0,13	0,26	2,05
Échantillons expérimentaux			
SAterre12	0,54	1,45	2,68
SAairair12	0,62	1,84	2,97
SAairsol12	0,59	1,69	2,86
VAL12-11-22	0,58	1,56	2,69
SAterre13	0,52	1,35	2,60
SAairair13	0,66	1,90	2,88
SAairsol13	0,53	1,57	2,96

Annexe 9 – Valeurs des intensités spectrales normalisées mesurées en RMN du proton pour toutes les collections

Collection Simon (Suisse)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution								
	5,30-5,80	4,10-4,35	2,73-2,87	2,25-2,36	1,93-2,13	1,55-1,70	1,20-1,43	0,82-0,94	0,10-0,20
	Lipides -CH=CH-	Lipides CH ₂ -OCOR	Lipides =HC-CH ₂ -CH	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂	Lipides (CH ₂) _n -CH=CH	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂	Lipides (CH ₂) _n	Lipides CH ₃	Hydroxy- apatite
Simon VAL-06	ND	ND	ND	ND	20124	ND	22019	22432	23847
Simon TRE-11	16615	ND	ND	ND	ND	ND	25840	24859	23939
Simon AIG-10	21616	ND	ND	ND	ND	ND	39686	36287	28921
Siomon AIG-43	ND	ND	ND	ND	20804	ND	22734	23134	23871
Simon AIG-48	ND	ND	ND	ND	19209	ND	21190	21670	23030

NA : non attribué ; NI : non individualisable (pic présent mais superposé au massif) ; ND : non détectable

Collection de l'Inrap Grand Est nord (France)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution								
	5,30-5,80	4,10-4,35	2,73-2,87	2,25-2,36	1,93-2,13	1,55-1,70	1,20-1,43	0,82-0,94	0,10-0,20
	Lipides -CH=CH-	Lipides CH ₂ -OCOR	Lipides =HC-CH ₂ -CH	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂	Lipides (CH ₂) _n -CH=CH	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂	Lipides (CH ₂) _n	Lipides CH ₃	Hydroxy- apatite
Sorbey-1-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	22021	22806	25000
Sorbey-1-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19096	19626	18301
Sorbey-1-4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	21721	22310	23600
Sorbey-1-5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	21715	23014	27170
MV-5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	25031	24703	24240
MV-6-1	ND	ND	ND	ND	20517	ND	25120	24488	23307
MV-6-2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	23882	23326	22930
MV-6-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	24477	23437	23385
MV-6-4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	21872	22403	23671
MV-13-1	20135	ND	ND	ND	29801	ND	51576	40478	25967
MV-13-2	24545	ND	ND	ND	32335	ND	59564	47693	33020
MV-13-3	17494	ND	ND	ND	26028	ND	42974	38374	29197
MV-13-4	40686	ND	ND	ND	35096	ND	50746	42872	30839
MV-13-5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19904	20658	21799
MV-13-6	30198	ND	ND	ND	64594	ND	140195	109117	ND
MV-13-7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	16287	16202	15317
MV-13-8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12129	12214	ND
MV-13-9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9944	ND	10020

NA : non attribué ; NI : non individualisable (pic présent mais superposé au massif) ; ND : non détectable

Collection de Prague (République tchèque)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution								
	5,30-5,80	4,10-4,35	2,73-2,87	2,25-2,36	1,93-2,13	1,55-1,70	1,20-1,43	0,82-0,94	0,10-0,20
	Lipides -CH=CH-	Lipides CH ₂ -OCOR	Lipides =HC-CH ₂ -CH	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂	Lipides (CH ₂) _n -CH=CH	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂	Lipides (CH ₂) _n	Lipides CH ₃	Hydroxy- apatite
PRG/91	67182	27995	42749	ND	132963	ND	516608	281390	ND
PRG242/93	26869	23689	ND	41220	45047	ND	272307	93104	30700
PRG343/94	29885	25243	ND	47354	51555	ND	312421	104046	30885
PRG342/94	25879	22430	ND	37987	44165	ND	182357	73734	28899
PRG596/95	29587	36944	ND	71504	64827	ND	435683	172405	ND
PRG709/2001	28119	25907	ND	46168	49979	ND	ND	90645	28396
PRG717/2003	21038	ND	ND	ND	31811	ND	109315	51899	27712
PRG1116/2004	28908	21213	ND	36300	47142	51948	228129	73524	26965
PRG827/2004	24772	21450	ND	37907	43248	ND	230927	89870	32908
PRG518/2005	25047	22059	ND	40198	46253	ND	229457	98505	34429
PRG567/2010	26045	19460	ND	28884	39593	ND	156172	60512	25754
PRG1021/2010	21820	ND	19618	ND	29559	ND	71461	39146	23399

NA : non attribué ; NI : non individualisable (pic présent mais superposé au massif) ; ND : non détectable

Collection de l'IRCGN (France)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution								
	5,30-5,80	4,10-4,35	2,73-2,87	2,25-2,36	1,93-2,13	1,55-1,70	1,20-1,43	0,82-0,94	0,10-0,20
	Lipides -CH=CH-	Lipides CH ₂ -OCOR	Lipides =HC-CH ₂ -CH	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂	Lipides (CH ₂) _n -CH=CH	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂	Lipides (CH ₂) _n	Lipides CH ₃	Hydroxy- apatite
IRCGN-01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	23075	23262	23969
IRCGN-02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	21396	22283	25148
IRCGN-03	ND	ND	ND	ND	19203	ND	20981	21004	21254
IRCGN-06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	23131	23871	30877
IRCGN-07	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20247	18424	34535
IRCGN-08	ND	ND	ND	ND	18263	ND	20719	20618	22383
IRCGN-12	ND	16530	ND	ND	ND	15450	ND	17223	33601
IRCGN-14	ND	ND	ND	ND	ND	6906	ND	ND	18033
IRCGN-15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	21490	22490	23658
IRCGN-16	ND	ND	ND	ND	20192	ND	22212	22645	24193
IRCGN-17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	24730	24749	26785
IRCGN-18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	23267	24173	27953
IRCGN-19	18048	ND	ND	ND	23731	ND	33796	29969	23435
IRCGN-20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20935	22722	32183
IRCGN-22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	33296	30667	26319
IRCGN-24	ND	ND	ND	ND	19193	ND	20627	20686	21556
IRCGN-25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	21305	22803	25660
IRCGN-26	ND	ND	ND	ND	ND	ND	24836	24924	25430
IRCGN-27	ND	ND	ND	ND	ND	ND	21914	22873	25114
IRCGN-28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	24478	25039	26200
IRCGN-29	ND	ND	ND	ND	ND	ND	28782	28757	30308
IRCGN-30	ND	ND	ND	ND	ND	ND	31867	29987	28535
IRCGN-31	ND	ND	ND	ND	ND	ND	21209	22211	23865
IRCGN-32	ND	ND	ND	ND	17325	ND	20447	21404	22075
IRCGN-33	ND	ND	ND	ND	ND	ND	23963	23456	23462
IRCGN-35	ND	ND	ND	ND	21071	ND	22234	22954	ND
IRCGN-36	ND	ND	ND	ND	31417	ND	29576	26340	ND
IRCGN-37	ND	ND	ND	ND	20112	ND	20995	ND	27875
IRCGN-38	ND	ND	ND	ND	ND	ND	27540	27036	25274
#3/2002	47883	ND	ND	ND	52652	ND	107466	81725	39169
#4/2002	27287	ND	ND	ND	50722	ND	110793	75471	29524
#6/2003	109339	62664	45315	111463	141182	135433	821188	210666	ND
#2/2003	49566	ND	40927	ND	54707	ND	120119	88228	ND
#9/2002	24081	ND	ND	ND	34311	ND	66562	53845	31846

NA : non attribué ; NI : non individualisable (pic présent mais superposé au massif) ; ND : non détectable

Collection de l'École de Chirurgie (France)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution								
	5,30-5,80	4,10-4,35	2,73-2,87	2,25-2,36	1,93-2,13	1,55-1,70	1,20-1,43	0,82-0,94	0,10-0,20
	Lipides -CH=CH-	Lipides CH ₂ -OCOR	Lipides =HC-CH ₂ -CH	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂	Lipides (CH ₂) _n -CH=CH	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂	Lipides (CH ₂) _n	Lipides CH ₃	Hydroxy- apatite
EC12-2502	26692	20033	21840	ND	35456	ND	100450	51695	23410
EC12-2693	45610	22834	24492	41071	63614	ND	348100	108739	25589
EC12-2673	18545	ND	18927	ND	24243	ND	50286	34455	24582
EC12-2652	87598	33780	34520	73420	125785	104736	599039	163041	24357

NA : non attribué ; NI : non individualisable (pic présent mais superposé au massif) ; ND : non détectable

Collections de Bruxelles (Belgique)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution								
	5,30-5,80	4,10-4,35	2,73-2,87	2,25-2,36	1,93-2,13	1,55-1,70	1,20-1,43	0,82-0,94	0,10-0,20
	Lipides -CH=CH-	Lipides CH ₂ -OCOR	Lipides =HC-CH ₂ -CH	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂	Lipides (CH ₂) _n -CH=CH	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂	Lipides (CH ₂) _n	Lipides CH ₃	Hydroxy- apatite
BRUCHAT-2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	22840	22885	21871
BRUCHAT-4	24190	ND	ND	ND	ND	ND	105914	90658	52929
BRUCHAT-13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	33996	32975	26912
BRUMANAGE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	21606	22504	23500
BRUULB-1	89804	44197	27774	110957	153637	148348	873173	207719	ND
BRUULB-2	140270	67619	28754	187049	241436	232262	1578646	339565	ND
BRUULB-3	51623	23629	24204	47286	78964	69682	392298	111226	22400
BRUULB-4	44453	ND	ND	ND	37612	ND	73343	45414	26640
BRUULB-5	122737	52930	35942	141675	193563	172273	1104334	242562	23084
BRUULB-6	143236	72677	45898	141136	191603	169303	1115384	252920	27874
BRUULB-8	147668	66005	50220	186783	228621	235919	1446470	277261	13680
BRUULB-9	157495	73352	39154	210431	268187	260866	1727585	353616	22666
BRUULB-10	230047	112174	44689	336119	380786	380030	2863621	544804	23091
BRUULB-11	43527	24508	24171	47758	66275	67875	353754	93465	19235
BRUULB-12	130528	69965	36916	188423	222699	230808	1398068	292457	20771
BRUULB-14	105632	54239	36341	79404	141652	106524	701836	192077	ND
BRUULB-18	89361	48539	28515	125306	147074	159114	933242	193086	19428
BRUULB-19	93068	50579	27803	130649	161610	168169	1003779	291077	21644
BRUULB-20	43074	27388	24330	52288	69016	72775	361389	97466	24923
BRUULB-44	96564	90460	35772	99349	129566	125009	757990	186074	29368

NA : non attribué ; NI : non individualisable (pic présent mais superposé au massif) ; ND : non détectable

Collection de Milan (Italie)

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution								
	5,30-5,80	4,10-4,35	2,73-2,87	2,25-2,36	1,93-2,13	1,55-1,70	1,20-1,43	0,82-0,94	0,10-0,20
	Lipides -CH=CH-	Lipides CH ₂ -OCOR	Lipides =HC-CH ₂ -CH	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂	Lipides (CH ₂) _n -CH=CH	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂	Lipides (CH ₂) _n	Lipides CH ₃	Hydroxy- apatite
MIL-19-L4R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	21365	18464	28737
MIL-33-L5R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	22733	23626	24937
MIL-39-L6R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	22271	23125	24400
MIL-55-L9R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	24216	24525	25097
MIL-62-L8R	ND	ND	ND	ND	19286	ND	23306	23817	26448
MIL-1	17154	ND	ND	ND	20729	ND	23813	23515	23773
MIL-9	ND	ND	ND	ND	19861	ND	22134	22419	26526
MIL-12	ND	ND	ND	ND	19987	ND	22664	22525	22651
MIL-15	ND	ND	ND	ND	19481	ND	21255	21795	23250
MIL-56	ND	ND	ND	ND	19207	ND	21795	22004	23543
MIL-41	15961	ND	ND	ND	20859	ND	36417	30175	25823
MIL-47	ND	ND	ND	ND	18946	ND	20661	21229	24191
MIL-70	ND	ND	ND	ND	19937	ND	22871	22699	23068
MIL-85	ND	ND	ND	ND	19392	ND	21151	21623	22873
MIL-94	ND	ND	ND	ND	ND	ND	22146	22778	23841
MIL-L1F	16892	ND	ND	ND	22511	ND	32970	31496	27310

NA : non attribué ; NI : non individualisable (pic présent mais superposé au massif) ; ND : non détectable

Échantillons archéologiques

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution								
	5,30-5,80	4,10-4,35	2,73-2,87	2,25-2,36	1,93-2,13	1,55-1,70	1,20-1,43	0,82-0,94	0,10-0,20
	Lipides -CH=CH-	Lipides CH ₂ -OCOR	Lipides =HC-CH ₂ -CH	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂	Lipides (CH ₂) _n -CH=CH	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂	Lipides (CH ₂) _n	Lipides CH ₃	Hydroxy- apatite
LYON-03	ND	ND	9760	ND	ND	12802	ND	14051	16285
SB3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	21194	ND	43112
SSPM3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	18579	19157	21803

NA : non attribué ; NI : non individualisable (pic présent mais superposé au massif) ; ND : non détectable

Échantillons expérimentaux

Identifiant	Gamme de déplacements chimiques (ppm) et attribution								
	5,30-5,80	4,10-4,35	2,73-2,87	2,25-2,36	1,93-2,13	1,55-1,70	1,20-1,43	0,82-0,94	0,10-0,20
	Lipides -CH=CH-	Lipides CH ₂ -OCOR	Lipides =HC-CH ₂ -CH	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂	Lipides (CH ₂) _n -CH=CH	Lipides OCO-CH ₂ -CH ₂	Lipides (CH ₂) _n	Lipides CH ₃	Hydroxy- apatite
SAterre12	17087	ND	ND	ND	ND	ND	25305	23491	21314
SAairair12	26989	22391	ND	ND	39648	ND	145308	76092	30071
SAairsol12	24197	ND	ND	ND	31358	ND	85427	54478	26562
VAL12-11-22	21638	19673	20033	ND	25089	ND	56073	35296	21239
SAterre13	16119	ND	ND	ND	18938	ND	25256	24808	24233
SAairair13	17480	ND	ND	ND	26500	ND	67063	49510	27963
SAairsol13	17435	ND	ND	ND	24693	ND	57301	43311	26898

NA : non attribué ; NI : non individualisable (pic présent mais superposé au massif) ; ND : non détectable

Annexe 10 – Valeurs de l'aire spectrale normalisée mesurée en RMN du proton pour toutes les collections

Identifiant	Aire
Collection Simon	
Simon VAL-06	0,29
Simon TRE-11	0,28
Simon AIG-10	0,37
Simon AIG-43	0,31
Simon AIG-48	0,28
Collections de l'Inrap Grand Est nord	
Sorbey-1-1	0,29
Sorbey-1-3	0,20
Sorbey-1-4	0,28
Sorbey-1-5	0,27
MV-5	0,34
MV-6-1	0,29
MV-6-2	0,27
MV-6-3	0,28
MV-6-4	0,28
MV-13-1	0,34
MV-13-2	0,40
MV-13-3	0,34
MV-13-4	0,48
MV-13-5	0,24
MV-13-6	0,62
MV-13-7	0,21
MV-13-8	0,16
MV-13-9	0,15
Collection de Prague	
PRG/91	0,78
PRG242/93	0,39
PRG343/94	0,41
PRG342/94	0,39
PRG596/95	0,60
PRG709/2001	0,45
PRG717/2003	0,31
PRG1116/2004	0,36
PRG827/2004	0,40
PRG518/2005	0,42
PRG567/2010	0,33
PRG1021/2010	0,30
Collections de l'IRCGN	
IRCGN-01	0,29
IRCGN-02	0,31
IRCGN-03	0,27
IRCGN-06	0,28
IRCGN-07	0,22
IRCGN-08	0,27
IRCGN-12	0,22
IRCGN-14	0,09
IRCGN-15	0,25
IRCGN-16	0,28
IRCGN-17	0,33
IRCGN-18	0,26
IRCGN-19	0,30
IRCGN-20	0,26
IRCGN-22	0,34
IRCGN-24	0,30
IRCGN-25	0,26
IRCGN-26	0,34
IRCGN-27	0,28
IRCGN-28	0,33
IRCGN-29	0,39
IRCGN-30	0,48
IRCGN-31	0,26
IRCGN-32	0,23
IRCGN-33	0,28

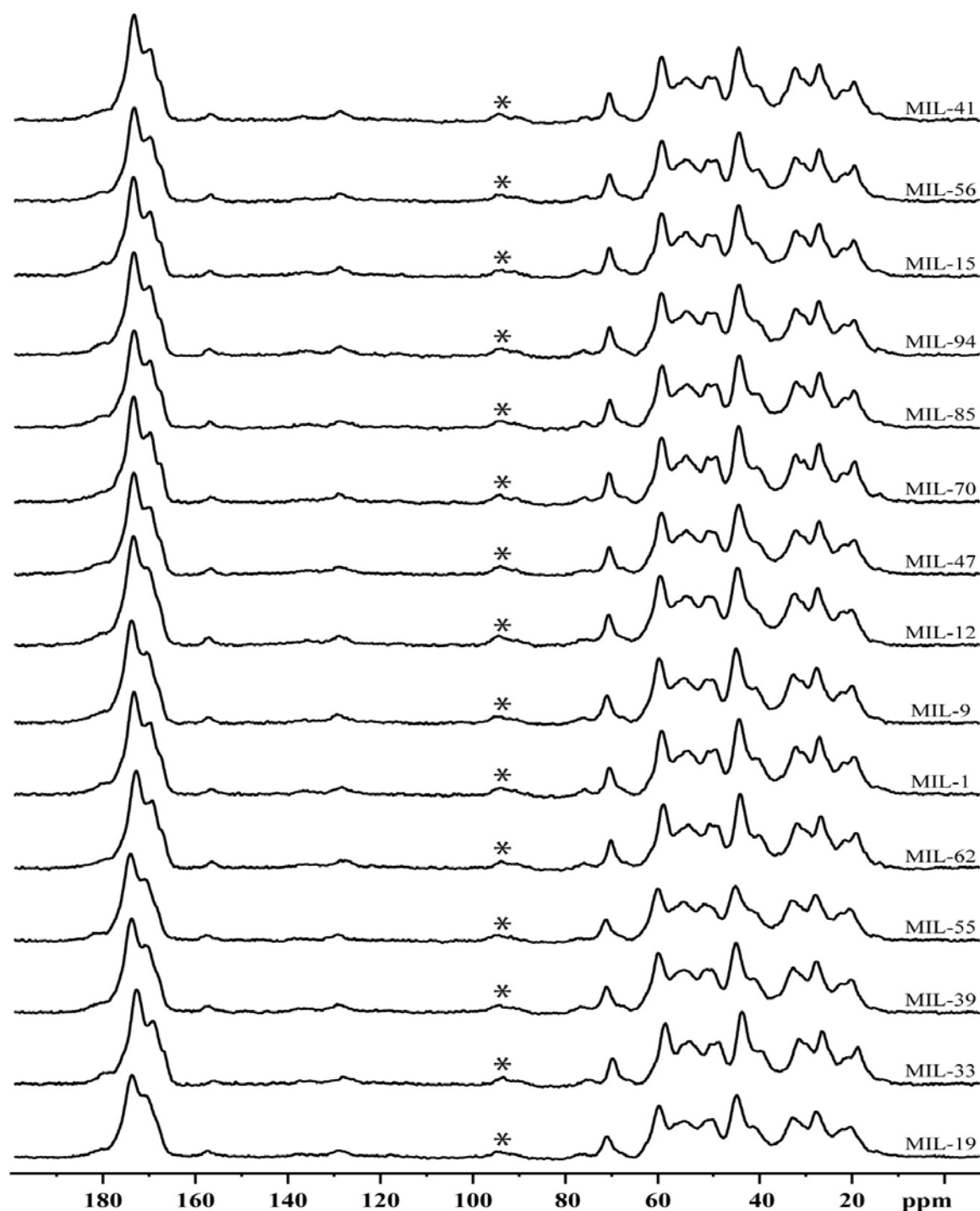
Identifiant	Aire
IRCGN-35	0,27
IRCGN-36	0,29
IRCGN-37	0,30
IRCGN-38	0,28
#3/2002	0,60
#4/2002	0,45
#6/2003	0,71
#2/2003	0,58
#9/2002	0,39
Collection de l'École de Chirurgie	
EC12-2502	0,37
EC12-2693	0,43
EC12-2673	0,31
EC12-2652	0,53
Collections de Bruxelles	
BRUCHAT-2	0,27
BRUCHAT-4	0,55
BRUCHAT-13	0,30
BRUMANAGE	0,28
BRUULB-1	0,62
BRUULB-2	0,76
BRUULB-3	0,41
BRUULB-4	0,48
BRUULB-5	0,62
BRUULB-6	0,77
BRUULB-8	0,74
BRUULB-9	0,82
BRUULB-10	1,00
BRUULB-11	0,40
BRUULB-12	0,73
BRUULB-14	0,70
BRUULB-18	0,58
BRUULB-19	0,59
BRUULB-20	0,72
BRUULB-44	0,70
Collection de Milan	
MIL-19-L4R	0,27
MIL-33-L5R	0,27
MIL-39-L6R	0,28
MIL-55-L9R	0,30
MIL-62-L8R	0,28
MIL-1	0,30
MIL-9	0,29
MIL-12	0,28
MIL-15	0,28
MIL-56	0,27
MIL-41	0,28
MIL-47	0,28
MIL-70	0,28
MIL-85	0,28
MIL-94	0,28
MIL-L1F	0,30
Échantillons archéologiques	
SB3	0,31
SSPM3	0,24
Lyon-03	0,16
Échantillons expérimentaux	
SAterre12	0,28
SAairair12	0,43
SAairsol12	0,37
VAL12-11-22	0,33
SAterre13	0,28
SAairair13	0,33
SAairsol13	0,32

Annexe 11 – Spectres RMN du carbone-13 des 15 individus de la collection MIL utilisés pour l'étude de l'influence des facteurs « âge au décès » et « sexe »

* : bande de rotation

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; masse initiale (MIL-19) = 129,2 mg ; masse initiale (MIL-33) = 109,9 mg ; masse initiale (MIL-39) = 126,6 mg ; masse initiale (MIL-55) = 122,9 mg ; masse initiale (MIL-62) = 118,8 mg ; masse initiale (MIL-1) = 111,8 mg ; masse initiale (MIL-9) = 120,6 mg ; masse initiale (MIL-12) = 117 mg ; masse initiale (MIL-47) = 121,5 mg ; masse initiale (MIL-70) = 114,4 mg ; masse initiale (MIL-85) = 118,5 mg ; masse initiale (MIL-94) = 114,9 mg ; masse initiale (MIL-15) = 110,6 mg ; masse initiale (MIL-56) = 118,9 mg ; masse initiale (MIL-41) = 125,4 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

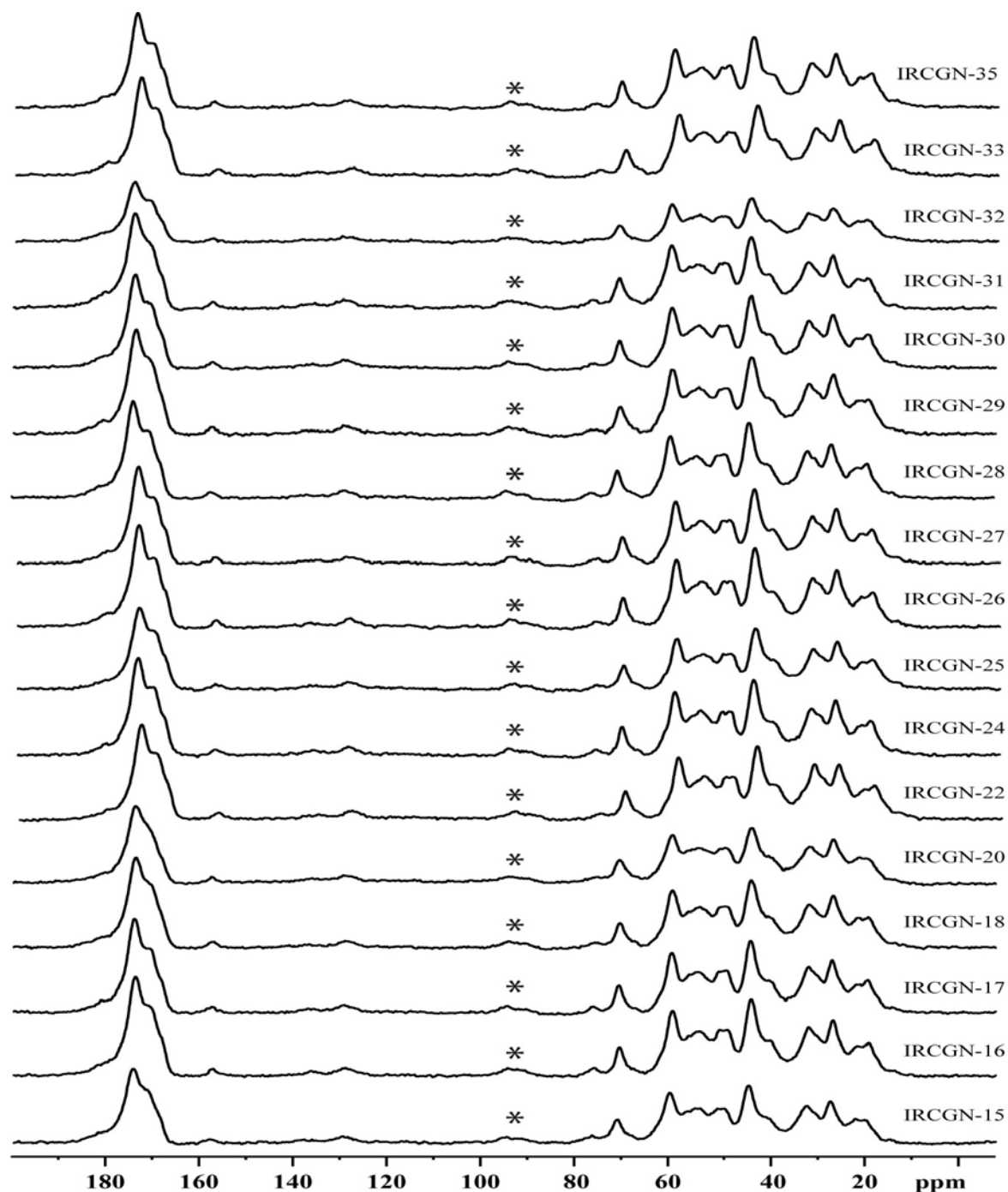


Annexe 12 – Spectres RMN CPMAS du carbone-13 des 17 individus de la collection IRCGN utilisés pour l'étude de l'influence des facteurs « âge au décès » et « sexe »

* : bande de rotation

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; masse initiale (IRCGN-15) = 140,5 mg ; masse initiale (IRCGN-16) = 119,2 mg ; masse initiale (IRCGN-17) = 131 mg ; masse initiale (IRCGN-18) = 132,9 mg ; masse initiale (IRCGN-20) = 132,6 mg ; masse initiale (IRCGN-22) = 128,5 mg ; masse initiale (IRCGN-24) = 116,7 mg ; masse initiale (IRCGN-25) = 126,5 mg ; masse initiale (IRCGN-26) = 116,5 mg ; masse initiale (IRCGN-27) = 130,6 mg ; masse initiale (IRCGN-28) = 128,5 mg ; masse initiale (IRCGN-29) = 107,5 mg ; masse initiale (IRCGN-30) = 129 mg ; masse initiale (IRCGN-31) = 125 mg ; masse initiale (IRCGN-32) = 131,9 mg ; masse initiale (IRCGN-33) = 119,1 mg ; masse initiale (IRCGN-35) = 132 mg.

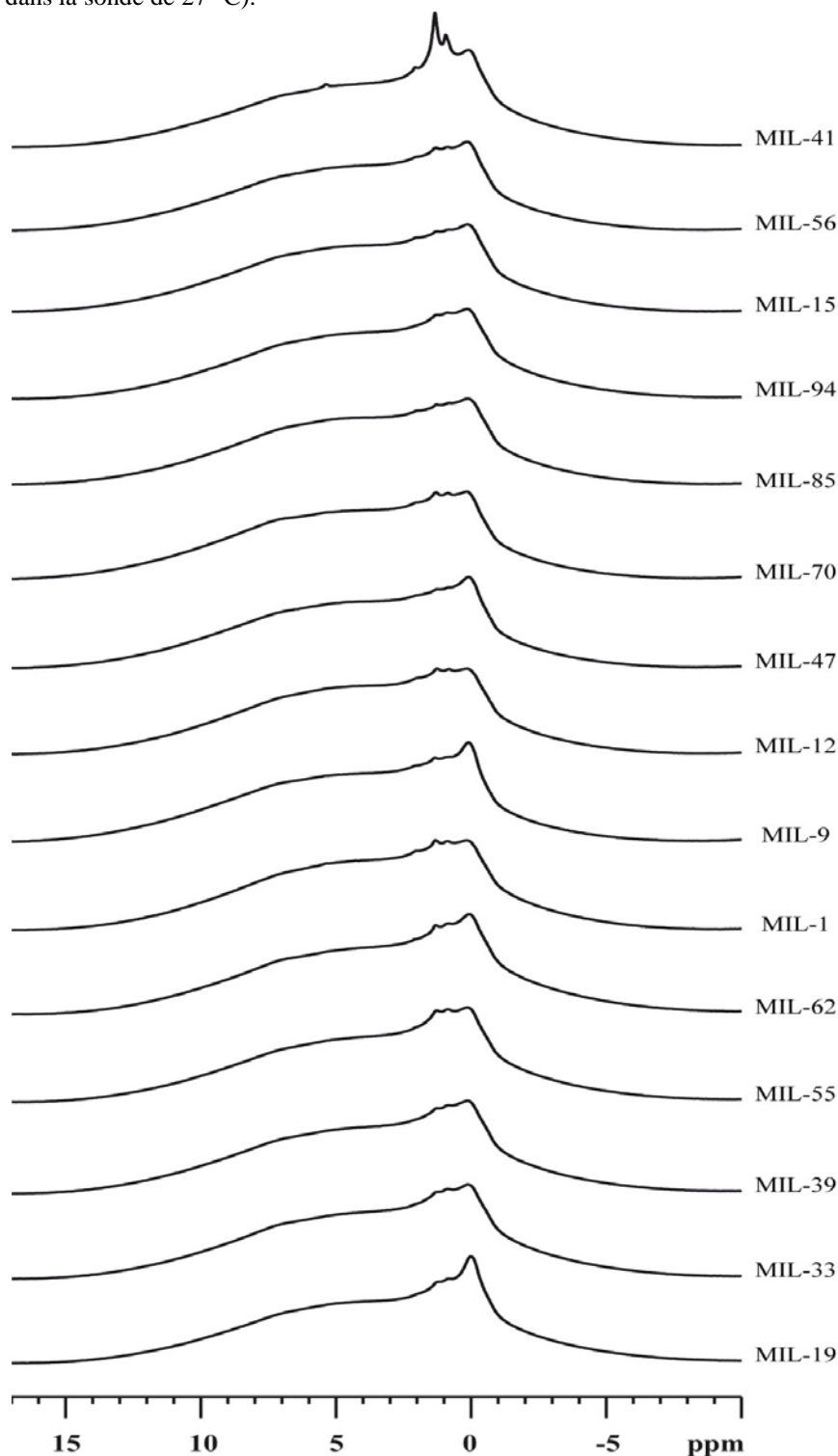
Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du carbone de 125,68 MHz ; séquence CPMAS avec une vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 10 240 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 2,85$ μ s ; $\tau_c = 1,5$ ms ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).



Annexe 13 – Spectres RMN CPMAS du proton des 15 individus de la collection MIL utilisés pour l'étude de l'influence des facteurs « âge au décès » et « sexe »

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; masse sèche (MIL-19) = 129,6 mg ; masse sèche (MIL-33) = 115,4 mg ; masse sèche (MIL-39) = 119,3 mg ; masse sèche (MIL-55) = 117,3 mg ; masse sèche (MIL-62) = 121,1 mg ; masse sèche (MIL-1) = 111,7 mg ; masse sèche (MIL-9) = 118,2 mg ; masse sèche (MIL-12) = 119,1 mg ; masse sèche (MIL-47) = 115,7 mg ; masse sèche (MIL-70) = 115 mg ; masse sèche (MIL-85) = 116,3 mg ; masse sèche (MIL-94) = 117,6 mg ; masse sèche (MIL-15) = 115,6 mg ; masse sèche (MIL-56) = 115 mg ; masse sèche (MIL-41) = 131,3 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).



Annexe 14 – Spectres RMN CPMAS du proton des 17 individus de la collection IRCGN utilisés pour l'étude de l'influence des facteurs « âge au décès » et « sexe »

Informations : les spectres sont normalisés pour une masse sèche de 100 mg ; masse sèche (IRCGN-15) = 129,3 mg ; masse sèche (IRCGN-16) = 114,7 mg ; masse sèche (IRCGN-17) = 121 mg ; masse sèche (IRCGN-18) = 131,2 mg ; masse sèche (IRCGN-20) = 123,9 mg ; masse sèche (IRCGN-22) = 135,8 mg ; masse sèche (IRCGN-24) = 118,6 mg ; masse sèche (IRCGN-25) = 138,2 mg ; masse sèche (IRCGN-26) = 116,9 mg ; masse sèche (IRCGN-27) = 127,1 mg ; masse sèche (IRCGN-28) = 128 mg ; masse sèche (IRCGN-29) = 99,9 mg ; masse sèche (IRCGN-30) = 127,2 mg ; masse sèche (IRCGN-31) = 122,9 mg ; masse sèche (IRCGN-32) = 132,2 mg ; masse sèche (IRCGN-33) = 119,9 mg ; masse sèche (IRCGN-35) = 130,4 mg.

Paramètres d'acquisition : champ de 11,7 T ; fréquence de résonance du proton de 500 MHz ; vitesse de rotation à l'angle magique de 10 kHz ; 8 acquisitions ; $D_1 = 5$ s ; $P_1 = 4,5$ μ s ; température ambiante de 20 °C (température dans la sonde de 27 °C).

